

**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Farmacia**  
**Departamento de Microbiología II**

**Caracterización del plásmido de virulencia  
de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis**

Memoria presentada para optar al  
Grado de Doctor en Farmacia  
por Miguel Buisán Catevilla

Dirigida por el Dr. Rafael Rotger Anglada

**Madrid, 1995**

D. CÉSAR NOMBELA CANO, CATEDRÁTICO-DIRECTOR DEL  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA  
DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que D. Miguel Buisán Catevilla ha realizado en el  
Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de  
la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del  
Dr. D. Rafael Rotger Anglada, el trabajo que presenta para optar  
al grado de doctor en Farmacia, con el título:  
**Caracterización del plásmido de virulencia de *Salmonella enterica*  
serovar Enteritidis.**

Y para que conste, firmo la presente  
certificación en Madrid, a 26 de Mayo de 1995.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'César', followed by a large, stylized, looping flourish that extends to the right.

Fdo. : Dr. D. César Nombela Cano.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una Beca del Ministerio de Educación y Ciencia para la formación del personal Investigador.

*A mi familia y amigos.*



Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han colaborado en la realización de este trabajo:

Al Dr. César Nombela Cano, por permitirme la realización del mismo en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

Al director de esta tesis, Dr. Rafael Rotger Anglada, por la constante ayuda e interés mostrado tanto en su periodo de realización como de escritura.

A Antonia, por su amistad y permanente apoyo, especialmente en los momentos más difíciles de su realización. A José Manuel, compañero de fatigas investigadoras, sin cuya colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

A Mada, por su amistad, ayuda y consejo. A Alejandra, Isabel y María Yuste por su amistad y colaboración en todo momento.

A Amalia, Alberto y Javier Regidor por su amistad.

A todos los compañeros del Departamento, especialmente a Benito, José Alberto y Elena, por su ayuda desinteresada.

# ÍNDICE

Abreviaturas .....	4
Introducción .....	5
1.1.- El plásmido de virulencia de <i>Salmonella</i> . ....	6
1.2.- Genes plasmídicos implicados en la virulencia de <i>Salmonella</i> . ....	7
1.2.1.- Región <i>spv</i> . ....	7
1.2.2.- Genes implicados en la resistencia al suero. ....	10
1.2.3.- Otros genes plasmídicos implicados en virulencia. ....	14
1.3.- Genes implicados en la replicación y estabilidad del plásmido. ....	15
1.3.1.- Coexistencia de varios replicones. ....	17
1.3.1.1.- Mecanismo de replicación de los plásmidos del grupo IncFII. ....	18
1.3.1.2.- Mecanismo de replicación de los plásmidos del grupo IncFIB. ....	22
1.3.2.- Sistema de resolución de multímeros. ....	26
1.3.3.- Sistemas de partición. ....	28
1.3.3.1.- Sistema de partición del plásmido de <i>Salmonella</i> . ....	34
Objetivos .....	37
Materiales y Métodos. ....	39
2.1.- Materiales. ....	40
2.1.1.- Medios de cultivo. ....	40
2.1.2.- Marcadores de pesos moleculares de DNA. ....	40
2.1.3.- Plásmidos. ....	41
2.1.4.- Cepas. ....	43
2.1.5.- Nomenclatura. ....	43
2.1.6.- Soporte informático. ....	43
2.2. - Métodos. ....	44
2.2.1.- Extracción de DNA plasmídico de <i>Salmonella</i> . ....	44
2.2.2.- Extracción de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i> . ....	44
2.2.3.- Minilisis de colonias. ....	45
2.2.4.- Transformación de <i>E.coli</i> con CaCl <sub>2</sub> . ....	46
2.2.5.- Transformación a partir de colonias. ....	47
2.2.6.- Electroforesis en geles de agarosa. ....	48
2.2.7.- Extracción de DNA a partir de geles de agarosa. ....	48
2.2.8.- Determinación de tamaño, pureza y concentración de DNA. ....	48
2.2.9.- Tratamientos enzimático del DNA. ....	49

2.2.10.- Purificación del DNA.....	51
2.2.11.- Ligación de fragmentos de DNA.....	52
2.2.12.- Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa. ....	52
2.2.13.- Hibridación de ácidos nucleicos. ....	53
2.2.14.- Secuenciación automática del DNA. ....	56
2.2.15.- Ensayo de estabilidad. ....	56
2.2.16.- Ensayos de incompatibilidad. ....	57
2.2.17.- Citometría de flujo. ....	57
2.2.18.- Amplificación de DNA por la técnica de P.C.R. ....	58
2.2.19.- Determinación de la resistencia al suero. ....	59
2.2.20.- Absorción del suero con suspensiones bacterianas.....	60
<b>Resultados.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1.- Cartografiado del plásmido de virulencia de <i>S. enteritidis</i>.....</b>	<b>62</b>
3.1.1.- Análisis y detección de plásmidos.....	62
3.1.2.- Clonación del plásmido pFM82139. ....	62
3.1.3.- Verificación del origen de las construcciones pMJ y pFM. ....	64
3.1.4.- Cartografiado de los clones pMJ y pFM. ....	69
3.1.5.- Cartografiado de la construcción pMJ002B.....	69
3.1.6.- Localización de los fragmentos <i>Hind</i> III en pFM82139. ....	73
3.1.7.- Orientación relativa de los fragmentos <i>Hind</i> III correspondientes a los clones pMJ005, pMJ001, pMJ004, pMJ002A y pMJ003. ....	78
3.1.8.- Ordenación de pMJ006 y pMJ002B. ....	78
3.1.9.- Orientación del fragmento <i>Hind</i> III de pMJ006. ....	79
<b>3.2.- Homología con el plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i>. ....</b>	<b>81</b>
<b>3.3.- Localización de algunos genes implicados en la virulencia de <i>S typhimurium</i>. y <i>S. enteritidis</i> . ....</b>	<b>82</b>
3.3.1.- Detección del gen <i>ro</i> k. ....	84
3.3.2.- Detección del gen <i>tra</i> T. ....	85
3.3.3.- Detección de <i>vag</i> C/ <i>vag</i> D.....	88
<b>3.4.- Resistencia al suero. ....</b>	<b>89</b>
<b>3.5.- Estudio de las regiones implicadas en replicación, mantenimiento e incompatibilidad de pFM82139. ....</b>	<b>90</b>

---

3.5.1.- Estudio de los mecanismos de replicación del plásmido pFM82139.....	90
3.5.1.1.- Clonación de las regiones de replicación de pFM82139.....	90
3.5.1.2.- Secuenciación de los replicones RepB y RepC.....	95
3.5.1.3.- Determinación del número de copias de RepB y RepC.....	109
3.5.1.4.- Estudio de la estabilidad de los replicones RepB y RepC. ....	110
3.5.2.- Estudio de la región de partición de pFM82139. ....	111
3.5.2.1.- Clonación de la región de partición de <i>S. enteritidis</i> .....	111
3.5.2.2.- Influencia de la región <i>parVP</i> en la estabilidad de los replicones RepB y RepC.....	112
3.5.3.- Estudio de la incompatibilidad de las regiones de replicación <i>repB</i> y <i>repC</i> .....	117
<b>Discusión.....</b>	<b>119</b>
<b>4.1. Comparación entre los plásmidos de virulencia de <i>S. enteritidis</i> y <i>S. typhimurium</i>. ....</b>	<b>120</b>
<b>4.2. Replicación del plásmido de <i>S. enteritidis</i>.....</b>	<b>124</b>
4.2.1. Características del replicón RepB.....	124
4.2.2. Características del replicón RepC.....	126
<b>4.3. Función de la región <i>parVP</i>.....</b>	<b>127</b>
4.3.1. Incompatibilidad y partición.....	128
<b>Conclusiones .....</b>	<b>130</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>132</b>

$\Delta$ : deleción

A: absorbancia

*aph3'*: gen que codifica fosfotransferasa de aminoglucósidos.

Amp: ampicilina

*Amp*: resistencia a ampicilina

ATP: adenosina-5'-trifosfato

*bla*: gen que codifica  $\beta$ -lactamasa

CIP: *calf intestinal phosphatase*

D.O.: densidad óptica

dATP: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato

dCTP: 2'-desoxicitosina-5'-trifosfato

dGTP: 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato

Dig-dUTP. 11-(2'-desoxuridina-5'-trifosfato) digoxigenina

DNA: ácido desoxirribonucleico

dTTP: 2'-deoxitimidina-5'-trifosfato

EDTA: ácido etilén-diamino tetraacético

EtBr: bromuro de etidio

FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorter*

FDG: Fluoresceína- $\beta$ -D-galactopiranosido

IP: Ioduro de Propidio

IPTG: Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

*kan*: resistencia a kanamicina

kb: 1000 pares de bases

kD: 1000 dalton

Km: kanamicina

*lacZ*: gen de *E. coli* que codifica  $\beta$ -galactosidasa

*lacZ'*: gen de *E. coli* que codifica el  $\alpha$ -péptido de la  $\beta$ -galactosidasa

MCS: sitio de clonación múltiple

N: Nucleótido sin determinar

NBT: sal de nitroazul-tetrazolio

nm: nanómetro

*ori*: origen de replicación

pb: pares de bases

rpm: revoluciones por minuto

SDS: lauril sulfato sódico

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

U: unidad de actividad específica

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

X-P: 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato

# 1.- INTRODUCCIÓN

## 1.1.- El plásmido de virulencia de *Salmonella*.

Se han descrito plásmidos portadores de genes de virulencia en un alto porcentaje de aislamientos clínicos pertenecientes a los serotipos *Salmonella typhimurium* (Jones *et al.*, 1982), *Salmonella enteritidis* (Hovi *et al.* 1988), *Salmonella dublin* (Terakado *et al.*, 1983, Chikami *et al.*, 1985) y *Salmonella choleraesuis* (Kawahara *et al.*, 1988), y también en serotipos causantes de enfermedad en animales, como *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* (Barrow *et al.*, 1987, Barrow y Lovell, 1988). Estos plásmidos presentan un tamaño variable (de 54 a 98 kb), pero constante dentro de cada serotipo, por lo que se les ha llamado "plásmidos serotipo-específicos" antes de caracterizarlos como plásmidos de virulencia. El plásmido de *Salmonella typhimurium* es el más ampliamente caracterizado. El plásmido de *Salmonella dublin* difiere bastante, salvo en la región denominada *spv*, que es altamente homóloga (Lax *et al.*, 1990). En otros serotipos (hasta un total de 12) se han hallado plásmidos similares, y si bien no se ha demostrado su implicación en la virulencia, presentan al menos regiones homólogas a *spv* (Williamson *et al.*, 1988, Roudier *et al.*, 1990). Por el contrario, *Salmonella typhi*, el serotipo causante de fiebre tifoidea en el hombre, carece de plásmido de virulencia, y no se han detectado regiones homólogas en su cromosoma (Roudier *et al.*, 1990, Fierer *et al.*, 1992).

Es conocida la participación de plásmidos en la virulencia de otras enterobacterias, principalmente *Shigella* y *Yersinia*. Sin embargo, los plásmidos de virulencia de *Salmonella* tienen un papel más limitado que los de estos otros géneros bacterianos (Gulig, 1990). Se ha demostrado en modelos de infección animal (ratón o pollo) que los plásmidos de *Salmonella* facilitan la diseminación sistémica y la multiplicación en ganglios linfáticos, bazo e hígado, pero que no afectan al desarrollo de gastroenteritis (Pardon *et al.*, 1986, Hackett *et al.*, 1986, Heffernan *et al.*, 1987).

Gulig y Doyle (1993) han medido la tasa de multiplicación *in vivo* de dos cepas isogénicas de *S. typhimurium*, una portadora del plásmido de virulencia (cepa silvestre), y la otra carente de él (cepa curada). Para ello han utilizado como marcador un plásmido termosensible (*ts*), que no se replica a 37 °C; cuanto mayor es la tasa de división de la bacteria, menor es la proporción de células que conservan el plásmido. No se observaron diferencias en la multiplicación en placas de Peyer (tejido linfolde del intestino), pero en ganglios linfáticos y bazo la cepa curada creció más lentamente que la silvestre. Además, el número total de células con plásmido *ts* fue similar en el caso de la cepa silvestre y la curada; esto indica que la cepa curada no es destruida con mayor facilidad, lo que contradice datos anteriores que indicaban que las cepas sin plásmido eran eliminadas rápidamente por los macrófagos (Hackett *et al.*, 1986). El tratamiento con gentamicina, un antibiótico que mata únicamente a las bacterias extracelulares, no afectó a los resultados, lo que indica que la mayoría de las bacterias se hallan intracelulares, independientemente de la presencia del plásmido de virulencia. Ahora bien, no ha podido demostrarse que el plásmido de



virulencia mejore la supervivencia o el crecimiento en el interior de los macrófagos (Gullig y Curtiss, 1987, Riikonen *et al.*, 1992), por lo que no está claro en que condiciones se produce el aumento en la tasa de crecimiento de las cepas portadoras del plásmido.

Es interesante la observación de que las cepas curadas inducen la proliferación de linfocitos T con receptor gamma-delta, a diferencia de las portadoras del plásmido, frente a las que proliferan linfocitos T  $\gamma/\delta$  (Emoto *et al.*, 1992); se ha descrito también que estas últimas inducen inmunosupresión en ratones (Hoertt *et al.*, 1989). Como la función concreta de los linfocitos T  $\gamma/\delta$  es desconocida, aunque se ha demostrado que son necesarios para la resistencia a la infección experimental en ratón por *Salmonella*, es difícil por el momento interpretar estos resultados.

## 1.2.- Genes plasmídicos implicados en la virulencia de *Salmonella*.

### 1.2.1.- Región *spv*.

Mediante la clonación de diferentes fragmentos del plásmido de virulencia en cepas de *Salmonella* curadas, se ha podido hallar una región capaz de restaurar la virulencia sistémica para el ratón (Gullig y Curtiss, 1988). Esta restauración se produce sólo cuando se clona en un plásmido de bajo número de copias (como es el caso del plásmido original), pero no cuando se expresa en multicopia (Williamson *et al.*, 1988). Mediante mutagénesis por transposición y subclonación se han localizado 5 genes que ocupan unas 6 kb, y son comunes a los distintos serotipos (Krause *et al.*, 1991, Roudier *et al.*, 1990). Estos genes han recibido diferentes denominaciones: *mka* (Taira y Rhen, 1989), *mkf* (Norel *et al.*, 1989), *spv* (Gullig, 1990) y *vag* (Pullinger *et al.*, 1989) en *S. typhimurium*; *mba* en *S. choleraesuis* (Matsui *et al.*, 1990) y *vsd* en *S. dublin* (Krause *et al.*, 1990), pero se ha llegado al acuerdo de nombrarlos como *spv* (*Salmonella* plásmido virulencia) (Gullig *et al.*, 1993) (Figura 1.1). Los datos que siguen representan un consenso entre los resultados obtenidos por los distintos grupos en cada uno de estos serovares; las diferencias observadas son pequeñas y pueden deberse tanto a las diferencias entre serotipos como en el método experimental.

Se han detectado cinco genes, *spvR*, *A*, *B*, *C* y *D*, así como las proteínas que codifican. El análisis genético ha mostrado que *spvR* es un gen regulador (Caldwell y Gullig, 1991, Fang *et al.*, 1991, Matsui *et al.*, 1991, Taira *et al.*, 1991), y que los cinco genes están organizados en forma de operón (Krause *et al.*, 1992), aunque las secuencias intercistónicas son mucho más largas (185 a 515 bp) de lo habitual (Gullig *et al.*, 1992).

Se han caracterizado por hibridación los RNA mensajeros, detectándose cuatro especies correspondientes a los genes *spvA*, *spvAB*, *spvABC* y *spvABCD*. Las cuatro tienen su inicio delante de *spvA* (hay dos comienzos alternativos próximos), como corresponde a un policistón;

además, la cantidad relativa de cada una descende en el orden citado (Krause *et al.*, 1992, Matsui *et al.*, 1993). Existen discrepancias sobre la existencia de posibles secuencias consenso de terminadores entre los diferentes genes (Krause y Guiney, 1991, Gullig *et al.*, 1992) que puedan explicar la cantidad relativa de cada RNA mensajero en función de la parada de la RNA-polimerasa, como parece lo más probable. Por otra parte, existen datos que prueban que *spvC* puede expresarse en ocasiones a partir de un promotor propio, independiente de *spvR* (Gullig, 1990, Coynault *et al.*, 1992).

El extremo amino-terminal de la proteína SpvR muestra homología con MetR, miembro de la familia LysR de proteínas reguladoras, y presenta el motivo típico "hélice-vuelta-hélice" responsable de la interacción con DNA (Pullinger *et al.*, 1989). La técnica de retardo en gel ha permitido comprobar la unión de SpvR a DNA (Matsui *et al.*, 1993). Los estudios de regulación se han llevado a cabo mediante fusiones de los distintos genes *spv* con un gen truncado *lacZ* o *cat* (gen testigo), a fin de obtener proteínas híbridas fácilmente detectables por su actividad  $\beta$ -galactosidasa o cloranfenicol-acetil-transferasa, respectivamente. También se han utilizado anticuerpos contra las proteínas Spv, que permiten su detección por el método de Western; este sistema tiene la ventaja de que puede trabajarse con genes no manipulados, en las condiciones originales (Valone *et al.*, 1993, Matsui *et al.*, 1993).

La presencia de *spvR* en *trans* (es decir, en un plásmido diferente del que contiene los genes cuya expresión se está estudiando) activa la expresión de todos los genes del operón, incluido el mismo *spvR* (Gullig *et al.*, 1993). Por lo tanto, la proteína SpvR es un activador de la transcripción, a diferencia de los otros miembros de la familia LysR, que son proteínas represoras.

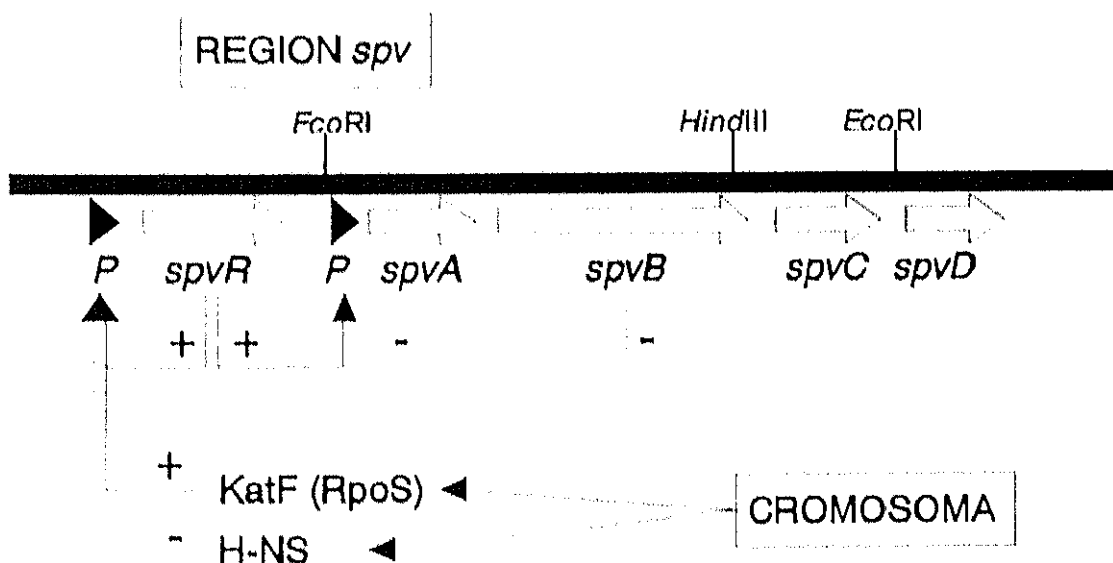


Figura 1.1.- Mapa de la región *spv* del plásmido de *Salmonella typhimurium*.

Las fusiones de *spvR* con genes testigos han permitido observar que *spvR*, además de estar inducido por su propio producto, está sometido a represión por SpvA y SpvB, ya que cuando se provoca la expresión en *trans*, tanto de *spvA* como de *spvB* por separado, disminuye la expresión de *spvR*. La secuencia del extremo amino-terminal de SpvB de *S. choleraesuis* muestra homología parcial con CatM, una proteína reguladora de *Acinetobacter calcoaceticus* implicada en el control del metabolismo del catecol. Ambas proteínas presentan el motivo "hélice-vuelta-hélice" para interacción con DNA (Abe *et al.*, 1994). SpvA presenta homología en su extremo carboxilo-terminal con la porción amino-terminal de SpB, pero no contiene el motivo de unión a DNA, por lo que el mecanismo de interacción debe ser distinto. Spink *et al.* han observado también en *S. dublin* que una deleción en *spvA* aumenta la expresión de *spvR*, y su sobreexpresión la anula. Una construcción con la segunda mitad de *spvR* delecionada y sin expresión de SpvB (por pérdida del marco de lectura), anuló en *trans* la expresión de *spvR*. Esto sugiere que la capacidad reguladora de SpvA radica en su extremo amino-terminal (Spink *et al.*, 1994).

La expresión del operón *spv* tiene lugar en fase estacionaria, siendo mínima durante el crecimiento exponencial. Esta observación se ha realizado mediante fusiones con genes testigos tanto de *spvR* (Spink *et al.*, 1994, Abe *et al.*, 1994, Coynault *et al.*, 1992), como de los restantes genes del operón (Fang *et al.*, 1991, Krause *et al.*, 1992). La expresión puede inducirse en fase exponencial provocando una carencia de fuente de carbono (glucosa). Se ha medido también la expresión con anticuerpos obtenidos frente a las diferentes proteínas, con lo que se puede valorar los efectos ambientales sobre la cepa original de *S. dublin* portadora del plásmido (Valone *et al.*, 1993). De este modo se ha observado la expresión en fase exponencial cuando se acidifica el medio a pH 5.0 y cuando se elimina el hierro con un agente quelante (Valone *et al.*, 1993, Spink *et al.*, 1994); estos efectos pasan desapercibidos cuando el operon está inducido por falta de glucosa. El choque térmico a 42 °C estimula también la expresión, especialmente cuando se combina con carencia de glucosa. El efecto del oxígeno es controvertido, ya que algunos autores no han detectado nunca expresión en anaerobiosis (Valone *et al.*, 1993) y otros no observaron ninguna diferencia (Fang *et al.*, 1991, Spink *et al.*, 1994); de hecho, Fang *et al.* no detectaron tampoco efectos causados por la acidez ni la concentración de hierro sobre una fusión *spvB-lacZ* en *S. dublin*.

Como se ha discutido anteriormente, son varios los genes de virulencia que se expresan en condiciones de estrés. No se ha observado regulación de *spv* por *phoP*, *ompR* ni *cya-crp*. La expresión de genes en fase estacionaria está regulada en *E. coli* por *kafF* (denominado también *rpoS*) que codifica un factor  $\sigma$  alternativo,  $\sigma^S$ , capaz de facilitar la unión de la RNA-Polimerasa a promotores diferentes a los expresados habitualmente en fase exponencial. El gen *kafF* se ha detectado en *Salmonella* mediante PCR, empleando cebadores basados en la secuencia de *kafF* de *E. coli*, y se ha inactivado después por inserción para construir un mutante KatF<sup>-</sup>. Utilizando este mutante se comprobó que la expresión de *spvB* se reducía un 86% en fase estacionaria. La

virulencia por vía oral en ratón de un mutante *KatF*<sup>-</sup> portador del plásmido de virulencia es mucho menor que la de una cepa silvestre curada del plásmido; esto puede explicarse porque el mutante *KatF*<sup>-</sup> es anormalmente sensible al pH ácido, al peróxido de hidrógeno y a la carencia de nutrientes (Fang *et al.*, 1992, Norel *et al.*, 1992). Recientemente se ha logrado clonar *katF* de *S. typhimurium*, confirmándose su papel en la regulación de *spvR* conjuntamente con el propio producto de este gen, la proteína SpvR (Kowarz *et al.*, 1994).

La expresión de los genes *spv* en condiciones de estrés ambiental o metabólico hace suponer que se induzcan cuando *Salmonella* está parasitando intarcelularmente, como ocurre con otros determinantes de virulencia. Se han hecho mediciones de la expresión tras la infección *in vitro* de macrófagos y otros tipos de células cultivadas, y se ha detectado la inducción de *spvB-lacZ* inmediatamente después de la fagocitosis de la bacteria por macrófagos murinos peritoneales, siendo máxima a las dos horas (10-20 veces mayor) (Fierer *et al.*, 1993). La alcalinización de los lisosomas (tratando los macrófagos con monensina o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) no afecta a la inducción. El tratamiento con IFN-gamma reduce la expresión, pero no afecta a la viabilidad. Estos resultados contrastan con los múltiples datos que afirman que los genes *spv* no afectan a la supervivencia en macrófagos (Riikonen *et al.*, 1992, Heffernan *et al.*, 1987, Gulig *et al.*, 1993). La expresión en macrófagos ha sido también puesta en evidencia mediante una fusión de *spvA* con los genes *pap* de *E. coli*, que codifican la síntesis de fimbrias. Las proteínas de las fimbrias pueden detectarse por inmunofluorescencia en los macrófagos infectados (Rhen *et al.*, 1993).

Otro gen que ha mostrado un efecto regulatorio sobre la virulencia de *Salmonella* es *hns*, que codifica una proteína, H-NS, similar a las histonas de eucariotas (Harrison *et al.*, 1994) y que puede afectar al superenrollamiento del DNA. La expresión de los genes *spv* se ve también afectada por *hns*, ya que un mutante H-NS<sup>-</sup> muestra mayor inducción en fase estacionaria, y la sobreexpresión de *hns* reprime totalmente a *spvR*. Es sabido que *hns* controla en *E. coli* la expresión de genes sometidos a regulación por la presión osmótica del medio (Higgins *et al.*, 1990). El cultivo en medio con concentraciones crecientes de NaCl demostró que la expresión de *spvB* decrece a partir de 200 mM, y lo hace de forma correlativa al incremento de superenrollamiento negativo de un plásmido testigo. Finalmente, la expresión de *spvB* se ve también reducida en mutantes afectados en la topoisomerasa I, una de las enzimas que controlan el superenrollamiento de DNA (O'Birne y Dorman, 1994).

### 1.2.2.- Genes implicados en la resistencia al suero.

En el recorrido desde el intestino a órganos internos, las cepas de *Salmonella* que causan infección sistémica van a estar expuestas a la acción bactericida del sistema del complemento. Este es considerado como uno de los mecanismos de defensa más importantes del hospedador frente a las infecciones extraintestinales causadas por bacterias Gram-negativas y es por ello que

la resistencia al suero va a ser una característica de virulencia significativa de las bacterias patógenas invasivas. Así, las enterobacterias aisladas de hemocultivos son casi siempre resistentes al suero.

Entre los componentes de la superficie celular bacteriana de los microorganismos Gram-negativos son las cápsulas, lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa los que más claramente están implicados en la interacción con el complemento.

El principal determinante de la resistencia al suero de *Salmonella* parece depender de los lipopolisacáridos (LPS), cuya biosíntesis está mediada por varias agrupaciones de genes cromosómicos, si bien recientemente se ha hecho evidente que la estructura del LPS puede estar en algunos casos influenciada por plásmidos. Estos LPS poseen largas cadenas oligosacáridicas que constituyen el antígeno O y van a provocar que el complejo de ataque a membrana (MAC) constituido por el componente terminal del complemento C5b-9 se forme a cierta distancia de las regiones hidrofóbicas de la membrana externa debido a la deposición preferencial de C3 en las cadenas laterales del LPS. El MAC es de esta forma desperdiciado sin interrumpir la integridad ni de la membrana externa ni de la interna de la bacteria.

La cápsula polisacáridica, importante en la resistencia al suero de otras bacterias Gram-negativas, no está presente en los serotipos no tifoideos de *Salmonella*.

Se han publicado datos contradictorios acerca del papel del plásmido de virulencia en la resistencia al suero de *Salmonella* y en especial de *S. typhimurium*. Helmuth *et al.* (1985) fueron los primeros en describir un incremento de la supervivencia en suero de cobaya de distintos serovares de *Salmonella* portadores del plásmido con respecto a las cepas curadas. Hackett *et al.* (1986) confirmaron estos resultados en *S. typhimurium*. De forma análoga, Vandenbosch *et al.* (1987) notificaron que el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* estaba asociado con la resistencia al suero humano tras la activación del complemento tanto por la vía clásica como por la alternativa. Sin embargo, Gulig y Curtiss (1987) no encontraron diferencias en cuanto a resistencia al suero entre cepas portadoras del plásmido y las carentes de él. Resultados similares obtuvieron Jones *et al.* con sueros de distintos orígenes mientras que Rhen y Sukupolvi (1988) observaron un claro incremento de la resistencia al suero de cobaya asociado a la posesión del plásmido.

Varios son los factores que podrían explicar las discrepancias existentes entre los distintos autores concernientes al papel del plásmido de virulencia en la resistencia al suero de *Salmonella*: los diferentes orígenes de los sueros empleados así como las distintas técnicas experimentales utilizadas, la variedad de cepas de *Salmonella* usadas en los diferentes laboratorios o el nivel basal de resistencia debido a los genes cromosómicos, como son los que codifican la síntesis del antígeno O, podrían todos ellos contribuir a generar diferencias en la tolerancia al suero.

Se han descrito cuatro *loci* plasmídicos que afectan a la resistencia al suero bajo ciertas circunstancias. Todos estos determinantes están situados fuera de la región *spv* y no parecen ser esenciales para la virulencia en el modelo de ratón *Ity*<sup>s</sup>.

Hackett *et al.* (1987) subclonaron en un cósmido multicopia un fragmento del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* que codificaba una proteína de membrana externa de 11 kD y que confería resistencia al suero (la misma que tenía la estirpe silvestre) tanto a cepas rugosas de *E. coli* como a estirpes rugosas de *S. typhimurium* curadas del plásmido de virulencia. La introducción del gen que codificaba para dicha proteína en las cepas curadas de *Salmonella* no era capaz de restaurar la síntesis normal del LPS, que confería el fenotipo liso, lo cual indicaba que el mecanismo de resistencia mediado por ese gen no implicaba la síntesis de las largas cadenas de antígeno O de los LPS. Más tarde Heffernan *et al.* (1992) determinaron que este gen, al que denominaron *rck* (*resistance killing complement*), codificaba una proteína de membrana externa de 17 kD y que clonado en un cósmido multicopia confería una elevada resistencia al suero tanto a cepas rugosas como lisas de *E. coli*, *S. minnesota* y *S. typhimurium*. Igualmente determinaron la secuencia nucleotídica de este gen que consta de 555 pb y codifica una proteína de 185 aminoácidos. Esta proteína, Rck, es homóloga a una familia de proteínas de membrana externa de bacterias Gram-negativas dos de las cuales han sido asociadas a fenotipos de virulencia: PagC, proteína de origen cromosómico necesaria para la supervivencia de *S. typhimurium* en macrófagos y para su virulencia en ratón, y Ail, proteína también cromosómica de *Yersinia enterocolitica* capaz de mediar la adherencia e invasión a células epiteliales. Otros miembros de esta familia son la proteína de membrana externa del bacteriófago lambda Lom, expresada en *E. coli*, y OmpX de *Enterobacter cloacae*. Utilizando el fragmento de DNA que contiene *rck* como sonda estos mismos autores detectaron secuencias homólogas en los plásmidos de virulencia de *S. dublin* y *S. enteritidis* pero no en *S. choleraesuis*.

El mecanismo de acción que estos autores proponen para Rck es el de provocar una alteración de la configuración de las moléculas de C9, asociadas a los complejos C5b-9 situados en la superficie bacteriana, de forma que afecta a su polimerización, con la consiguiente inhibición de la formación e inserción de los complejos de ataque a membrana (MAC) tubulares en la membrana externa de *Salmonella*. Así, en una cepa silvestre de *Salmonella* la mayoría de los complejos C5b-9 interaccionarán con los LPS, y los pocos que alcanzaran la membrana externa serían inactivados por Rck.

Un segundo *locus* que parece estar implicado en la resistencia al suero es *traT*, el cual codifica una lipoproteína de membrana externa TraT. El gen *traT* forma parte del operón de transferencia por conjugación de los plásmidos del tipo F (el factor de fertilidad de *E. coli*) y junto al gen *traS* del mismo operón, es responsable de la capacidad reducida de la célula hospedadora de actuar como receptora en procesos de conjugación promovidos por plásmidos relacionados. El plásmido de *S. typhimurium* conserva sólo parte de la región *tra*, probablemente como un vestigio

de su formación, por lo que no es conjugativo (Rhen y Sukupolvi, 1988). Su papel en la resistencia al suero ya había sido descrito por Moll *et al.* (1980) al observar que el producto génico TraT codificado por el plásmido de resistencia a antibióticos R6-5 confería a ciertas cepas de *E. coli* una mayor resistencia al suero (aunque solo permitía una supervivencia en concentraciones de suero algo superiores al 2%). El gen *traT* fue descrito en *S. typhimurium* por Rhen y Sukupolvi (1988) quienes demostraron que confería resistencia al suero a ciertas estirpes de *E. coli* y de *S. typhimurium*, si bien este efecto era mucho más marcado en las primeras. Estos mismos autores localizaron en dicho gen la mutación denominada anteriormente SS-A (Sukupolvi *et al.*, 1984) que incrementaba la permeabilidad de la membrana externa a los agentes hidrofóbicos. Hovi *et al.* (1988) determinaron que el plásmido de virulencia de *S. enteritidis*, aunque contenía el gen *traT*, no afectaba a la ya de por sí elevada resistencia al suero de este serovar. Posteriormente se determinó su secuencia nucleotídica y se vio que contenía un marco abierto de lectura para una proteína de 243 aminoácidos semejante a las proteínas TraT de los plásmidos del grupo F de incompatibilidad. Dicha proteína contenía una secuencia señal de 20 aminoácidos, una zona amino-terminal de unión a lípidos, y dos regiones fuertemente hidrofóbicas muy cercanas la una a la otra en la proteína madura (Sukupolvi *et al.*, 1990). Sukupolvi *et al.* (1992) corroboraron estos resultados y observaron que la resistencia al suero mediada por el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* desaparecía con la inactivación insercional del gen *traT*. Asimismo demostraron la ausencia de este gen en *S. dublin*.

Un tercer locus que confiere resistencia al complemento ha sido descrito en el plásmido de virulencia de una cepa de *S. dublin* y parece ser que restaura, a la vez que la resistencia al suero, la síntesis de un antígeno O completo en ciertos mutantes parcialmente rugosos de esta cepa obtenidos por mutagénesis insercional de dicho plásmido con los transposones Tn1 o Tn5 (Terakado *et al.*, 1988, 1990). Anteriormente, Kawahara *et al.* (1989) estudiaron la relación entre LPS y el plásmido de virulencia y sólo en una de las cepas de *S. dublin* estudiadas, la misma en la que Terakado aisló ese locus de resistencia, la curación de dicho plásmido alteraba la cadena polisacáridica del antígeno O, alteración que era restaurada tras la posterior reintroducción del plásmido. En ninguna de las demás cepas de *S. dublin* estudiadas ni en *S. enteritidis*, *S. typhimurium* o *S. choleraesuis*, la curación del plásmido suponía la pérdida del fenotipo liso debido a los LPS de cadena polisacáridica larga. Estos resultados sugerían que si bien los genes estructurales necesarios para la codificación de las enzimas responsables de la síntesis de los LPS no estaban en el plásmido de virulencia de *Salmonella*, al menos en el plásmido de *S. dublin* debía existir un factor regulador que podía alterar la longitud de la cadena del polisacárido O y que este factor sólo era expresado por algunas cepas de dicho serovar.

Por último, existe una región descrita por primera vez en el plásmido de *S. typhimurium*, denominada *rsk* (*reduced serum killing*), que parece que restaura la capacidad de estirpes lisas de *S. typhimurium* que contengan el plásmido de virulencia integrado en el cromosoma para crecer

en presencia de suero (Vandenbosch *et al.*, 1989a), no teniendo efecto alguno en cepas curadas (Vandenbosch *et al.*, 1989b). Dicha secuencia tiene una longitud de 66 pb y contiene dos series idénticas de 10 nucleótidos y una tercera degenerada que conserva 8 de los 10 nucleótidos. Esta región no parece que contenga ninguna secuencia codificante, ni un promotor para un gen estructural, sin embargo, guarda una gran similitud con conocidos elementos reguladores, lo que hace pensar que actuaría como lugar de unión de un elemento de este tipo. La integración del plásmido de virulencia, que no supone cambio alguno en el patrón lipopolisacárido de la bacteria, presumiblemente alteraría la regulación de los genes asociados a *rsk*. En cualquier caso, el resultado de esta alteración de la regulación de los genes del plásmido de virulencia es un incremento de la mortalidad de la bacteria por el complemento activado por la vía clásica. Es probable que la recuperación de la resistencia al suero provocada por la introducción de *rsk* en un plásmido multicopia se consiga a través del secuestro de dicho factor regulador en *trans*. No obstante la introducción del plásmido de virulencia en cepas con el plásmido integrado confiere una mayor resistencia al suero que cualquiera de los plásmidos multicopia portadores de la secuencia *rsk*. Esto implica la localización en el plásmido de virulencia de genes auxiliares, entre los que posiblemente se incluyan genes estructurales, de resistencia al suero (Vandenbosch *et al.*, 1989a).

Por todo ello Vandenbosch *et al.* (1989b) proponen que *rsk* representa a una región reguladora de la resistencia al suero de *S. typhimurium*, es decir, normalmente actuaría en el plásmido de virulencia autónomo controlando la producción de una molécula reguladora codificada por un gen plasmídico. Esta molécula podría ser un represor, puesto que la curación del plásmido no altera el fenotipo de resistencia al suero, mientras que la integración del mismo aparentemente disminuye la expresión de dicho fenotipo. Esta clase de control negativo de genes cromosómicos por *loci* plasmídicos es similar al descrito en *Yersinia pestis* (Yother *et al.*, 1986). Es posible que únicamente cuando este sistema regulador se encuentra perturbado, como en el caso de la integración plasmídica, el papel regulador del plásmido se haga aparente (Vandenbosch *et al.*, 1989b).

En resumen, se puede decir que son múltiples los *loci* de los plásmidos de virulencia de los distintos serovares de *Salmonella* que afectan la interacción con el complemento y que pueden tener funciones especializadas en ciertos serovares. Queda por determinar qué papel, si alguno tienen estos genes en la virulencia de los diferentes serovares durante el proceso infeccioso de las cepas silvestres.

### 1.2.3.- Otros genes plasmídicos implicados en virulencia.

Se ha relacionado también la presencia del plásmido de virulencia a la capacidad de adherirse e invadir células HeLa (Jones *et al.*, 1982). Aunque no se ha confirmado en papel del



plásmido en la invasión, si se han detectado varios genes responsables de la síntesis de fimbrias (*pefB, A, C, D, f*).

Basándose en experimentos de interrupción génica y en homologías con otros genes biosintéticos de fimbrias, se ha deducido que los genes *pefB* y *pefI* son probablemente reguladores, mientras que *pefA* parece codificar la subunidad principal de la fimbria, *pefC* la plataforma de ensamblaje en la membrana externa, y el producto de *pefD* sería una chaperona para el transporte citoplásmico de las subunidades. Aunque estos genes clonados se expresan en *Escherichia coli* dando lugar a la formación de fimbrias, no se han podido detectar fenómenos de hemaglutinación como los que producen otras fimbrias homólogas. Esto puede significar que utilizan otro receptor distinto para la adhesión, o que no son totalmente funcionales (Friedrich et al., 1993). Como existen otros genes cromosómicos en *Salmonella* para la síntesis de fimbrias (*sef*), y tampoco se conoce su participación en la patogénesis, es difícil especular sobre la contribución de las fimbrias de origen plasmídico.

### 1.3.- Genes implicados en la replicación y estabilidad del plásmido.

La mayor parte de la información de que se dispone acerca de los sistemas que aseguran la correcta replicación y estabilidad del plásmido de *Salmonella* se fundamenta en los conocimientos que se tienen sobre la actividad de esos mismos sistemas en otros plásmidos. Por ello en este tercer gran apartado se describirá lo que se conoce sobre la actividad general de esos mecanismos en otros plásmidos, haciendo mención, en algunos casos, de las particularidades de la actividad de los mismos en el plásmido de *Salmonella*.

Los plásmidos bacterianos, por definición, no son esenciales para la supervivencia celular excepto en determinadas condiciones ambientales donde ciertos genes de localización plasmídica, como aquellos que confieren resistencia a antibióticos o los implicados en vías metabólicas de degradación, proporcionan ventajas selectivas. Aunque algunos plásmidos se pierden de forma bastante rápida cuando la presión selectiva que los mantiene es eliminada, otros se perpetúan durante generaciones sin necesidad de la misma. Esto implica que muchos plásmidos no fundamentan su estabilidad en la continua selección para los genes que contienen.

El adecuado mantenimiento de un plásmido en una población microbiana requiere una precisa replicación y una correcta distribución del mismo a la progenie. Los plásmidos que normalmente se encuentran en la naturaleza pueden agruparse dentro de dos grandes categorías: plásmidos pequeños de elevado número de copias, y plásmidos grandes de bajo número de copias. Los primeros son heredados de forma eficaz simplemente mediante mecanismos de distribución al azar, puesto que dado su alto número de copias la probabilidad de que se produzcan células libres de plásmido es muy baja, tanto más cuanto mayor sea ese número. Por el contrario, la compleja naturaleza de los plásmidos grandes estables, que conforman el segundo grupo, y entre los que se

encuentra el plásmido de virulencia de las especies no tifoideas de *Salmonella*, requiere la actuación, individual o combinada, de diferentes mecanismos que aseguren su mantenimiento y eviten la formación de segregantes libres de plásmido después de la división celular. Aunque el estudio de los mecanismos empleados por el plásmido de virulencia de *Salmonella* está todavía en sus inicios, estos han sido profundamente estudiados en otros sistemas de replicación y podrían agruparse en cinco apartados:

- 1- Coexistencia de varios replicones (Bergquist *et al.*, 1986).
- 2- Regiones de partición (Austin, 1988).
- 3- Muerte postsegregacional de células libres de plásmido (Gerdes y Molin, 1986).
- 4- División celular acoplada (Ogura *et al.*, 1983).
- 5- Sistemas de resolución de multímeros (Austin *et al.*, 1981).

La presencia de varios replicones en un mismo plásmido es una característica común a muchos de los plásmidos pertenecientes a los grupos IncF de incompatibilidad. La presencia de un segundo replicón asegura la permanencia del plásmido en la bacteria aun cuando el primero no sea funcional por motivos como pueden ser la entrada de un segundo plásmido con un replicón de su mismo grupo de incompatibilidad.

La finalidad de los sistemas de partición es la separación física, el reparto, de las moléculas plasmídicas entre las células hijas, de forma análoga a la segregación mitótica de los cromosomas de las células eucariotas (Austin, 1988). Plásmidos con un número de copias muy bajo requieren alguna forma de partición activa si quieren evitar la producción de un 25% de células libres de plásmido por generación, cifra inherente con la distribución al azar de tales plásmidos.

La división celular acoplada y la muerte postsegregacional implican mecanismos similares, pero no idénticos, que actúan contra las células libres de plásmido (Gerdes y Molin, 1986, Jaffé *et al.*, 1985, Miki *et al.*, 1984). El plásmido codifica un potente factor tóxico que destruye a las células sin plásmido, mientras las células que lo retienen son protegidas por un antídoto codificado por el propio plásmido. En estos sistemas, como contrapartida a la consecución de una mayor estabilidad plasmídica, se produce una reducción del crecimiento de la población bacteriana debido a la muerte de las células que pierden el plásmido (Jaffé *et al.*, 1985).

Los sistemas de resolución de multímeros actúan mediante la conversión de multímeros plasmídicos en monómeros, incrementando así el número de moléculas plasmídicas disponibles para su distribución durante la división celular (Austin *et al.*, 1981). Se piensa que son empleados por plásmidos que se replican mediante un intermedio *theta* ( $\theta$ ). Hasta el momento no se ha demostrado que los plásmidos que se replican *vía* círculo rodante utilicen este sistema. El proceso es mediado por una recombinación intramolecular sitio-específica que requiere la presencia *in cis* de un lugar de resolución del multímero y de una proteína resolvasa especializada (Hatfull y Grindley, 1989).

Los estudios realizados sobre el plásmido de virulencia de *Salmonella* han demostrado la participación de algunos de estos mecanismos en el mantenimiento del mismo. La estabilidad segregacional (menos de  $10^{-7}$  segregantes libres de plásmido por célula por generación) del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* (Gulig y Curtiss, 1987) es similar a la observada en otros plásmidos de bajo número de copias, tales como F (Kline, 1985), P1 (Austin y Abeles, 1983b) y NR1 (Miki *et al.*, 1980). Semejante estabilidad ha sido detectada para el plásmido de 80 kb de *S. dublin* por Krause y Guiney (1991).

### 1.3.1.- Coexistencia de varios replicones.

Fueron Michiels *et al.* (1987) los primeros que notificaron la existencia de dos regiones de replicación autónoma en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium*. Una de ellas, a la que denominaron *repA*, era homóloga al replicón RepFIIA (perteneciente al grupo de incompatibilidad IncFII) y la otra, a la que denominaron *repB*, a RepFIB (perteneciente al grupo de incompatibilidad IncFI).

Posteriormente, Tinge y Curtiss (1990a) disintieron tanto en la localización como en la adscripción de esas regiones de replicación a los grupos de incompatibilidad citados. Para ellos, una de las regiones, *repB*, se encontraba situada en la misma región que señalaban Michiels *et al.*, pero hibridaba, aunque debilmente, con R100, plásmido del grupo IncFII de incompatibilidad y no con el plásmido F del grupo IncFI de incompatibilidad como postulaban dichos autores. La segunda región, a la que designaron como *repC*, fue aislada de una zona distinta a la correspondiente a *repA* o *repB* descrita por Michiels *et al.* (1987) e hibridaba, aunque también debilmente, con el plásmido F del grupo IncFI. Tinge y Curtiss (1990a) no encontraron ninguna función de replicación autónoma en la región *repA*, pero si una de partición. Aunque ni *repB* ni *repC* fueron excluidos por los plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncFI e IncFII ensayados por estos autores, los datos de hibridación situaban a dichos replicones dentro de ambos grupos de Incompatibilidad.

Otras características que estos autores definieron para ambos replicones fueron su bajo número de copias (2-3 por cromosoma) y que no dependían de la DNA polimerasa I para su replicación.

Tinge y Curtiss (1990b) estudiaron también la distribución de estos replicones en los distintos serovares de *Salmonella*. Vieron que la región *repB* del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* hibridaba con cepas de *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum* y *S. pullorum*, mientras que *repC* era sólo detectado en *S. choleraesuis* y *S. enteritidis*. Terakado *et al.* (1988) habían adscrito, con anterioridad a estos experimentos, el plásmido de virulencia de *S. dublin* al grupo IncFII de incompatibilidad, lo cual reforzaba el dato de la existencia de un único replicón, *repB*, en este serovar. Es también digna de resaltar la ausencia total de ambos replicones, así

como de la región de partición, en otros 30 serovares de *Salmonella* analizados por Tinge y Curtiss (1990b).

### 1.3.1.1.- Mecanismo de replicación de los plásmidos del grupo de incompatibilidad IncFII.

Dentro del grupo de incompatibilidad IncFII, los plásmidos más estudiados son R1, R6-5 y R100 (también llamado NR1 o R222). Todos ellos poseen un bajo número de copias (alrededor de dos por cromosoma) y un tamaño en torno a las 100 kb.

Entre las funciones del hospedador requeridas para su replicación hay que destacar la necesidad de los genes *dnaB*, *-C*, *-E*, *-F* y *-G*. Parece ser que es la *dnaG* polimerasa, normalmente utilizada para el inicio de la síntesis de los fragmentos de Okazaki, la encargada de sintetizar el RNA cebador que interviene en la iniciación de la replicación de los plásmidos de este grupo de incompatibilidad, puesto que no requieren ni la presencia de la RNA polimerasa de *E. coli* ni de otro tipo de RNA polimerasa sensible a rifampicina. La proteína DnaA parece que está implicada pero no es indispensable en la replicación de estos plásmidos (Tang *et al.*, 1989), existiendo un lugar de unión para dicha proteína cerca del origen de replicación (Womble *et al.*, 1985). Tampoco tienen necesidad de la DNA polimerasa I codificada por el gen *polA*. (Kolleck *et al.*, 1978).

La replicación en los plásmidos de este grupo se produce de forma unidireccional a partir de un único origen. Además del origen, existe un elemento absolutamente necesario para la replicación de los plásmidos IncFII: la proteína RepA1, producto del gen *repA1*. Esta proteína, de un peso molecular aproximado de 33 kD, va a ser la responsable de que estos plásmidos puedan replicarse en cepas *polA*<sup>-</sup>. Una vez que se ha unido al origen de replicación efectúa el ensamblaje del complejo de replicación, compuesto por las proteínas del hospedador que median en la replicación del plásmido (Masai y Arai, 1987, Miyazaki *et al.*, 1988, Ortega *et al.*, 1986).

La regulación negativa de la expresión del gen *repA1* es llevada a cabo tanto por un control de su transcripción como de la traducción de su mRNA en función del número de copias del plásmido.

Existe, además del gen *repA1*, otro gen *repA2* (también conocido como *copB*) cuyo producto, RepA2 (CopB), es una proteína básica de estructura tetramérica de 9.7 kD capaz de unirse a DNA (Dong *et al.*, 1985). Además de que su tamaño varía ligeramente entre plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad IncFII, su secuencia aminoacídica difiere en plásmidos mutuamente incompatibles como son R1 y R100, lo que unido al hecho de que mutantes *repA2* todavía expresan incompatibilidad, hace descartar totalmente un posible papel en el desempeño de esta función.

La principal función de RepA2 es la inhibición de la transcripción del gen *repA1*, siendo su diana el promotor de dicho gen. Mutaciones en el gen *repA2* producen un aumento del número de copias del plásmido, mientras que un exceso de RepA2 no produce efecto alguno en el mismo, posiblemente porque su diana ya esté saturada.

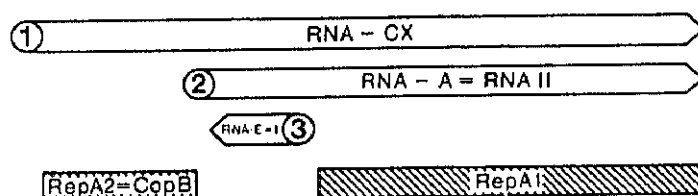
La expresión de *repA2* no es regulada por factores codificados por el plásmido, sino que es proporcional a la tasa de crecimiento. Esto hace que en una situación normal, con dos copias del plásmido por cromosoma, *repA2* no juegue ningún papel en la regulación de la replicación.

Antes de describir los demás elementos que forman parte del replicón de este grupo de incompatibilidad, pasemos a describir los promotores existentes. Se ha descrito la presencia de tres lugares a los que la RNA polimerasa se une fuertemente :

- 1- El promotor de RepA2 ( $P_{cx}$ ) cuyo transcrito, RNA-Cx, puede dar lugar también a RepA1 así como a un transcrito más corto llamado RNA-C.
- 2- El principal promotor de RepA1 ( $P_a$ ), que da lugar al transcrito RNA-A (también llamado RNA II) y posiblemente a un RNA cebador. En una situación con un número de copias normal, el promotor  $P_a$  está completamente inhibido por RepA2 y toda la producción de RepA1 proviene del mRNA policistrónico RNA-Cx (Dong *et al.*, 1985).
- 3- El promotor de *copA* cuyo transcrito es un RNA antisentido llamado RNA-I o RNA-E, que se describirá con más detalle posteriormente.

En la figura 1.2 se esquematizan los elementos anteriormente reseñados.

El producto del gen *copA* es capaz de inhibir la replicación mediante la inhibición de la expresión del gen *repA1*, lo cual es, por otro lado, la principal base de la incompatibilidad entre plásmidos del grupo IncFII. Sin embargo, no va a ser una inhibición transcripcional, como era la que ejerce RepA2, puesto que mutantes *copA* presentan el mismo nivel de transcripción que el plásmido silvestre, pero en cambio muestran una mayor expresión de la proteína RepA1 y un mayor número de copias. Esto sugiere que *copA* regula a RepA1 de forma post-transcripcional. Por otro lado, los mutantes *copA* muestran una incompatibilidad reducida, lo cual indica que ésta va a estar determinada por el producto de dicho gen.



**Figura 1.2.-** Los transcritos son indicados por barras en blanco marcadas con sus nombres. Los promotores son señalados mediante círculos en el comienzo de sus respectivos transcritos. Las proteínas aparecen como barras sombreadas bajo sus respectivos transcritos (Scott, 1984).

El producto del gen *copA* es una pequeña molécula de RNA de 91 pb llamada RNA-I, RNA-E o CopA. Este RNA es transcrito de forma constitutiva desde la cadena complementaria a la que transcribe RNA-A y RNA-Cx y en dirección contraria a estos (Stougaard *et al.*, 1981). RNA-I puede dar lugar a dos regiones con una estructura secundaria estable. Mutaciones puntuales que alteran la capacidad inhibidora de este RNA se sitúan en el bucle de 6 bases unido a un tallo de 22 que puede formar este RNA. Esta 6 bases son las implicadas, pues, en los procesos de incompatibilidad entre los replicones de este grupo (Rownd *et al.*, 1985).

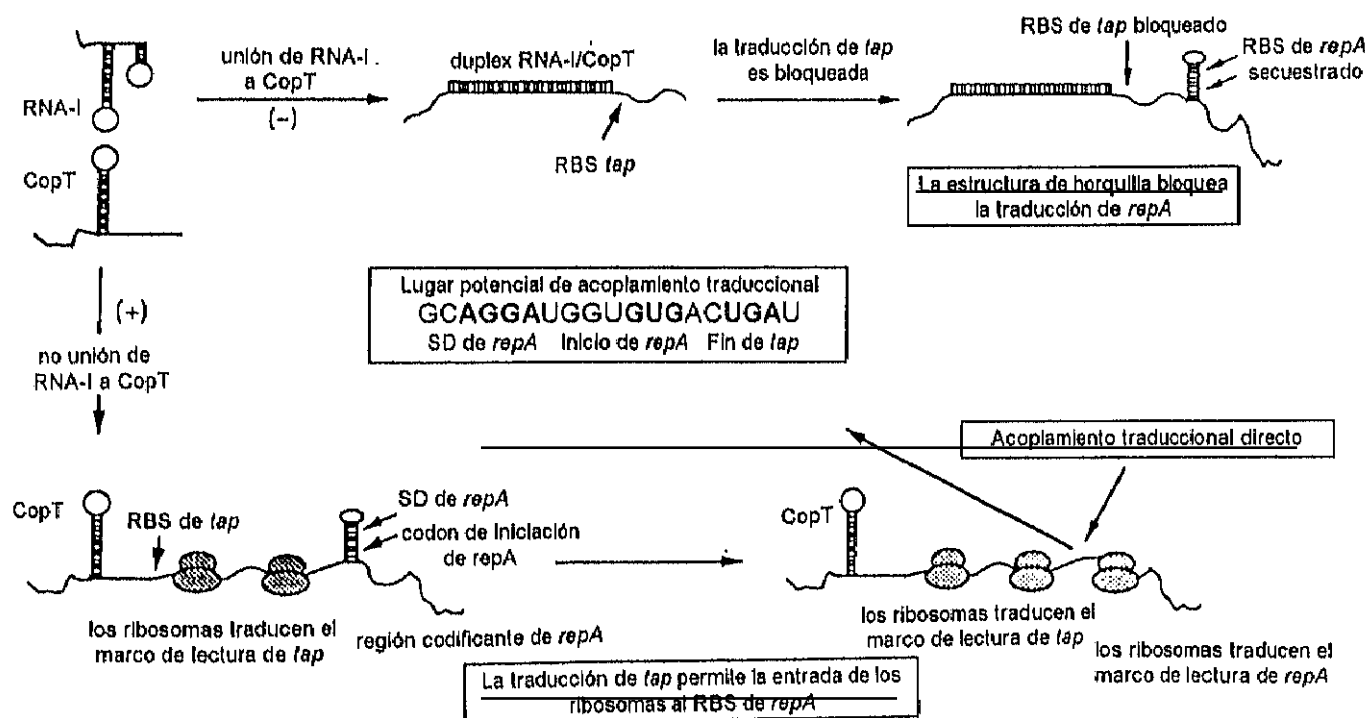
RNA-I es pues un represor en *trans* de la traducción del mRNA de *repA1* que puede funcionar uniéndose a las secuencias diana complementarias situadas en RNA-A y RNA-Cx formándose un duplex RNA-RNA (Light y Molin, 1983, Womble *et al.*, 1984). El bucle de 6 bases formado por el RNA-I es el lugar por donde interacciona con esas secuencias diana complementarias que también se encuentran formando un bucle de 6 bases. Esa secuencia diana complementaria a la que se une RNA-I recibe el nombre de CopT y se encuentra situada 1600 pb antes del origen de replicación. No obstante, existe una distancia de 85 pb entre la zona a la que se une el RNA-I y el inicio del gen estructural de RepA1. Para explicar cómo puede ejercer su efecto inhibitorio a tanta distancia se han barajado varias hipótesis.

Blomberg *et al.* (1992), estudiando el plásmido R1, han propuesto un mecanismo de control de la replicación en estos plásmidos IncFII. Según estos autores existe un marco de lectura entre los genes *copA* y *repA1* del plásmido R1 que está implicado en la expresión de este último gen. Este marco de lectura codifica un péptido líder de 24 aminoácidos, Tap (Péptido Activador de la Traducción), estando la expresión del gen *tap* regulada por el producto del gen *copA*, RNA-I. La localización de este marco de lectura está totalmente conservada en todos los plásmidos IncFII, aunque su secuencia aminoacídica puede variar bastante. Esto sugiere que es la propia traducción de *tap*, más que la proteína Tap en sí, la implicada en la expresión de *repA1*. La posible función de *tap* se puede deducir del hecho del solapamiento existente entre su codón de terminación y el RBS de la región *repA1*. Esto puede indicar la existencia de un acoplamiento traduccional que justifique la necesidad de la traducción de *tap* para que se produzca la expresión de *repA1*. Además, en esta región de replicación existen unas secuencias repetidas invertidas imperfectas, cuya secuencia nucleotídica varía entre los distintos plásmidos pertenecientes a este grupo de incompatibilidad. Estos autores proponen que estas repeticiones conducen a la formación en el mRNA de un bucle de gran estabilidad que secuestra el RBS de *repA1* y lo hace inaccesible a los ribosomas. Para activarlo, una vez que los ribosomas terminaran de traducir *tap*, reiniciarían la traducción en el codón de iniciación de *repA1* (acoplamiento traduccional directo). Por tanto, la síntesis de RepA1 es indirectamente controlada por RNA-I a través de la regulación de la traducción de *tap*.

El modelo de la actuación de *tap* en el control de la replicación del plásmido R1 que presentan estos autores se podría resumir como sigue: la frecuencia de replicación del plásmido R1 está

controlada por el RNA-I (CopA). Si RNA-I no se une a su diana, CopT, los ribosomas traducen el marco de lectura de *tap*, terminan en el codon de terminación UGA y reinician la traducción uniéndose al RBS de *repA1*. La síntesis de la proteína RepA1 es permitida y esta proteína sintetizada *de novo* actúa promoviendo la iniciación de la replicación en *oriR*. Pero si RNA-I se une a CopT, se forma un duplex. Esto impide la traducción del marco de lectura de *Tap*. Bajo estas condiciones el bucle estable de RNA que secuestra el RBS de *repA1* impide la traducción del marco de lectura de dicho gen. Como consecuencia no se sintetiza la proteína RepA1 y la iniciación de la replicación no se produce. Wagner *et al.* (1992) han demostrado que no hace falta que la formación del duplex sea completa, siendo suficiente un apareamiento de bases limitado entre los RNAs para que se produzca una inhibición efectiva (Figura 1.3).

Este modelo de Blomberg *et al.* sugiere que *Tap* puede relacionarse con un péptido líder, ya que existen evidencias de que los marcos de lectura de este tipo de péptidos son requeridos para una eficaz traducción de otros marcos de lectura situados a continuación de los mismos. Para estos autores el estado normal es que la traducción de *repA1* esté inactivada y sea necesario un proceso de activación de la síntesis de RepA1, tal como la traducción del marco de lectura del péptido líder, con el consiguiente acoplamiento traduccional al marco que codifica RepA1. Es este proceso de activación el que es inhibido por el RNA antisentido. Considerando la corta distancia existente entre el dúplex de RNA RNA-I-CopT y el RBS de *tap* (dos nucleótidos) es muy probable



**Figura 1.3.-** Modelo de la implicación de *tap* en el control de replicación del plásmido R1. Los signos (-) y (+) definen la vía inhibidora y la activadora respectivamente (Blomberg *et al.*, 1992).

que sea esa la estructura que impida a los ribosomas el acceso a este RBS y produzca la inhibición.

De forma análoga, otros autores (Wu *et al.*, 1992) piensan que el conjunto de mecanismos que controlan la frecuencia de replicación de los plásmidos IncFII parece ser muy eficaz en la inhibición del gen *repA1*, impidiendo así la síntesis de la principal proteína de iniciación de la replicación del plásmido durante la mayor parte del tiempo que dura el ciclo celular. Según estos autores, cuando el plásmido NR1 (R100) está en la célula en su habitual bajo número de copias, la concentración de la proteína represora RepA2 es suficiente para reprimir  $P_a$ , principal promotor de *repA1*, al 5% de su actividad, asegurando que el gen *repA1* sea transcrito al mínimo bajo estas condiciones. Al mismo tiempo RNA-I está presente en un exceso de 3 a 20 veces superior, dependiendo del grado de represión que sufra  $P_a$  por parte de RepA2; la presencia de RNA-I en exceso asegura que la traducción de la mayoría del mRNA de *repA1* esté impedida (también del que pudiera sintetizarse a partir de  $P_{ox}$ ). Además, la organización estructural del gen *repA1* es tal, que su mRNA solo puede ser traducido a muy bajo nivel. El acoplamiento de la traducción del mRNA de *repA1* al péptido líder Tap parece garantizar que los escasos mensajeros que por casualidad escapan a la interacción con el RNA-I sean traducidos a una tasa lo suficientemente alta como para proporcionar RepA1 en la cantidad necesaria para el inicio de la replicación.

#### **1.3.1.2.- Mecanismo de replicación de los plásmidos del grupo de incompatibilidad IncFIB.**

Como se comentó anteriormente, experimentos realizados por Tinge y Curtiss (1990a) demostraron que el segundo replicón de *S. typhimurium*, *repC*, hibridaba, aunque débilmente, con F, plásmido autotransmisible de 95 kb del grupo de incompatibilidad IncFI. El plásmido F contiene tres replicones. RepFIA y RepFIB han sido aislados como miniplásmidos de replicación autónoma a partir de los fragmentos *EcoRI* del plásmido F (Lovett y Hellinsky, 1976, Lane y Gardner, 1979). El tercer replicón, RepFIC, es homólogo a los aislados de los plásmidos del grupo de incompatibilidad IncFII pero no es funcional como resultado de la inserción de Tn1000. El replicón principal, RepFIA, tiene un comportamiento idéntico al del plásmido F completo, mientras que el replicón secundario, RepFIB, se mantiene de forma inestable cuando se encuentra en forma de miniplásmido.

RepFIB se localiza en el fragmento *EcoRI* de 7,6 kb del plásmido F (Lane y Gardner, 1979) y está más conservado entre los miembros del grupo IncFI de incompatibilidad que el replicón principal de F, RepFIA (Bergquist *et al.*, 1982, Bergquist *et al.*, 1986). En los plásmidos en los que está presente aparece casi siempre acompañado del replicón RepFIC y a menudo por RepFIA. Las regiones de replicación del tipo RepFIB han sido estudiadas, además de en el plásmido F (Gardner *et al.*, 1985), en los plásmidos P307 (Saul *et al.*, 1989) y pColV-K30 (PérezCasal y Crosa, 1989). Se han detectado también mediante hibridación DNA-DNA y PCR, no sólo en



plásmidos de los grupos IncF de incompatibilidad (IncFI,II,III y IV), sino también en un plásmido del grupo IncI y en otro del grupo IncP (Gibbs *et al.*, 1993). La secuenciación de siete de estos replicones de tipo RepFIB aislados de distintos plásmidos ha revelado una gran conservación de la secuencia (Gibbs *et al.*, 1993).

El replicón RepFIB expresa incompatibilidad del tipo incE con una regulación muy ajustada del número de copias, de una a dos por cromosoma (Spiers y Bergquist, 1992) y posee una organización genética muy similar a los replicones llamados de replicación escalonada (*step function*) (Nordström 1985) tales como R6K, RK2, pSC101, mini-F (miniplásmido artificial constituido por el replicón RepFIA) y mini-P (plásmido constituido por el replicón del plásmido de 90 kb que constituye la forma de profago del bacteriófago P1). El término *step function* hace alusión a la forma tan rápida y precisa en que un replicón de este tipo responde a un alto número de copias provocado artificialmente, bloqueando la replicación hasta que el número de copias se ha reducido lo suficiente, debido a las sucesivas divisiones celulares. Los replicones que muestran esta respuesta, si bien pertenecientes a grupos de incompatibilidad diferentes, comparten una organización genética similar, presentando series múltiples de repeticiones y una proteína esencial para la replicación de 32 a 38 kD (Filutowicz *et al.*, 1985), aunque no mantienen una gran homología de secuencia nucleotídica. En ellos el control del número de copias parece conseguirse mediante la interacción entre la proteína iniciadora de la replicación y esa serie de secuencias repetidas de DNA localizadas a cada lado del gen que codifica para dicha proteína.

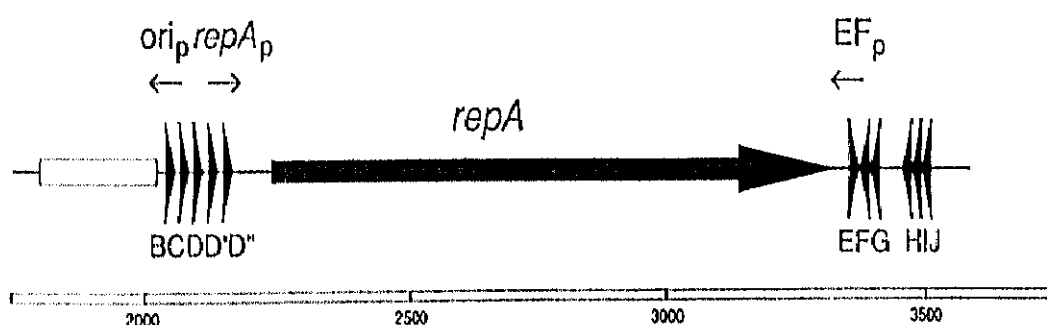
La similitud entre RepFIB y el replicón mini-P1 es más amplia que la existente entre RepFIB y los otros replicones de tipo *step function*. Por otra parte, los replicones del tipo repFIB que han sido estudiados a nivel genético, como el del plásmido enterotoxigénico P307 (Saul *et al.*, 1989, Spiers y Bergquist, 1992) y el del plásmido productor de colicinas pColV-K30 (Pérez-Casal y Crosa, 1987, 1989), muestran una escasísima variación entre sus secuencias nucleotídicas, a pesar de la naturaleza diversa de los plásmidos que los albergan (Gibbs *et al.*, 1993). Como todos los replicones del tipo *step function*, RepFIB contiene un único gen iniciador (*repA*) flanqueado por una serie de pequeñas secuencias de DNA repetidas, concretamente 5 copias de una secuencia de 21 pb que forman la repetición directa *upstream* BCDD'D" y 6 copias adicionales *downstream* en una disposición más complicada, EFGHIJ, responsables en parte estas últimas de la incompatibilidad de tipo E (Figura 1.4).

El promotor de *repA* (*repA<sub>p</sub>*) está situado dentro de las repeticiones BCDD'D", y la traducción de RepA comienza en el codón de iniciación CTG expresando una proteína de 39 kD (Spiers *et al.*, 1992) cuya secuencia aminoácida revela un alto grado de homología con la de mini-P1, especialmente bien conservada en los dominios en que presumiblemente tiene lugar la unión a DNA (Gibbs *et al.*, 1993), a pesar del hecho de que las secuencias repetidas a las que se unen estas proteínas son bastante diferentes.

La homología estructural entre RepFIB y los replicones tipo *step function* también sugiere de forma fehaciente que las repeticiones BCDD'D" y aproximadamente las 200 pb situadas a la izquierda de la secuencia B constituyen el origen de replicación. Este incluye una caja *dnaA* y 5 secuencias repetidas de 10 pb, ricas en AT, cada una de las cuales contiene un sitio *dam*, GATC (secuencia de reconocimiento de la metilasa Dam, que metila a la adenina) y que se encuentran alineadas sobre la estructura helicoidal del DNA. Según Gammie y Crosa (1991), la metilación de la adenina puede jugar un papel esencial en la interacción de RepA con el origen de replicación. Por un lado, los sitios *dam* van a intervenir en la desestabilización de la doble hélice en la zona en que se halla el origen de replicación, puesto que la metilación de las adeninas contribuye a la separación de las hebras de DNA (primera fase de la replicación). Por otro, van a ser responsables del reconocimiento por parte de la proteína iniciadora RepA del origen de replicación.

En cuanto a los requerimientos por parte de este tipo de replicones de la proteína DnaA (necesaria para el inicio de la replicación cromosómica de *E.coli* y de algunos plásmidos), existe cierta controversia. Mientras que para Gammie y Crosa (1991) no es necesaria para la replicación, a pesar de la existencia de la caja *dnaA*, para Splers *et al.* (1993) la replicación de RepFIB es dependiente de la DnaA polimerasa del hospedador. Esta dependencia de las funciones DnaA y Dam del hospedador es característica de los replicones de tipo *step function*. Aparece también en este origen un espaciador de GC, que mantiene la adecuada distancia entre los sitios de unión de DnaA y RepA, análogo al de mini-P1 aunque desplazado 20 pb en dirección a BCDD'D".

Las repeticiones BCDD'D" contienen dos promotores activos, *repA<sub>p</sub>*, que expresa *repA* (Gammie y Crosa, 1991, Splers y Bergquist, 1992, Splers *et al.*, 1993), y *ori<sub>p</sub>*, promotor con la capacidad de cruzar el origen de replicación y que no expresa ninguna proteína. Las repeticiones EFG también contienen un promotor funcional EF<sub>p</sub>, que no parece que exprese ninguna proteína.



**Figura 1.4.-** Replicón RepFIB de p307. Las secuencias repetidas BCDD'D" están asociadas con una serie de secuencias relacionadas con el origen de replicación (como la caja *dnaA* y una serie de lugares de reconocimiento de la metilasa Dam) representadas por un rectángulo en blanco. También contienen dos promotores activos *ori<sub>p</sub>* y *repA<sub>p</sub>*. En las repeticiones EF se sitúa un tercer promotor, EF<sub>p</sub>. La escala inferior indica pares de bases (Splers *et al.*, 1993).

Los tres promotores son reprimidos en *trans* por RepA, siendo *repA<sub>p</sub>* el más sensible de ellos.

La expresión del gen *repA* está por tanto autorregulada por la unión de RepA a las repeticiones BCDD'D'', que presumiblemente impide a la RNA polimerasa acceder a *repA<sub>p</sub>*. Esta represión también se puede conseguir cuando únicamente está presente la repetición D'' (Spiers y Bergquist, 1992). Gammie y Crosa (1991) han sugerido que la unión de RepA a BCDD'D'' es cooperativa, puesto que la progresiva delección de las secuencias repetidas provoca una disminución no lineal de la represión. Sin embargo, Spiers *et al.* (1993) han cuestionado estos resultados y demostrado que RepA se une con diferente fuerza a las distintas secuencias. Así, RepA tiene mayor afinidad hacia D'' (que cubre la secuencia -35 de *repA<sub>p</sub>*) que por B (que cubre la secuencia -10 de *ori<sub>p</sub>*). Esta diferente afinidad por las distintas secuencias ha sido propuesta como un mecanismo de control en algunos replicones como mini-F, en el que la proteína represora (E en este caso) se uniría primero para autorregular su expresión, a continuación sería titulada por las secuencias *downstream*, y si la concentración fuese suficientemente elevada activaría el origen de replicación (Chattoraj *et al.*, 1984, Trawick y Kline, 1985). Este modelo jerárquico trata de explicar la compleja actuación de la proteína RepA (Gammie y Crosa, 1991).

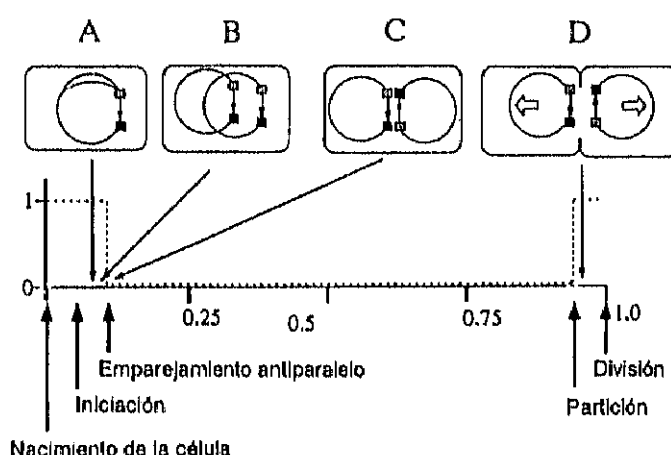
Las repeticiones situadas *downstream* de *repA*, EFGHIJ, y más concretamente HIJ, están implicadas en la regulación y control del número de copias, aunque es sabido que las repeticiones HIJ no son esenciales para la replicación (Shultz *et al.*, 1982). El número de copias de miniplásmidos RepFIB aumenta cuando se eliminan las secuencias HIJ o cuando éstas son suministradas en *trans*, lo cual es coherente con el secuestro de una molécula inhibidora de la replicación que tendría que ser RepA. Sin embargo, la concentración de RepA no afecta al control de número de copias, lo que contradice los modelos citados que se basan en la titulación de esta proteína por su unión a las secuencias repetidas (Pal y Chattoraj, 1988).

Se ha tratado de resolver esta paradoja proponiendo dos modelos en los cuales las moléculas de RepA interaccionan simultáneamente con las repeticiones *upstream* (BCDD'D'') y *downstream* (EFGHIJ), ya sean del mismo plásmido a través de la formación de un bucle (uniones intramoleculares), o bien de las dos moléculas hijas del plásmido en orientación antiparalela (uniones intermoleculares) (Abeles y Austin, 1991, Pal y Chattoraj, 1988). Para que esto se produzca RepA debe tener la capacidad de unirse a dos fragmentos de DNA simultáneamente, lo cual ha sido demostrado por Spiers *et al.* (1993). Esto ha sido estudiado en los plásmidos P1 y en R6K. Los datos obtenidos en P1 apoyan fuertemente el modelo de uniones intermoleculares antiparalelas: la región *downstream* actúa aunque se aproxime a sólo 15 pb de la *upstream*, distancia muy corta para formar un bucle; la presencia de ambas regiones en *cis* debería impedir, por la formación del bucle, la interacción intermolecular, y no lo hace; finalmente, la inhibición en *trans* del origen por la región *downstream* es máxima cuando las dos moléculas están en proporción 1:1 (Figura 1.5).

Según este modelo, cuando el plásmido se halla en una sólo copia, la posibilidades de iniciación de la replicación inducida por RepA son máximas. Una vez replicado, las dos moléculas hijas se aparean a través de las moléculas de RepA, bloqueándose recíprocamente ambos orígenes. Cuando la célula se divide, la partición separa las dos moléculas hijas, que quedan en condición de replicarse de nuevo

Dado el parentesco entre P1 y RepFIB, es probable que este modelo sean también aplicable a este replicón.

De este modo se explica tanto el control de número de copias como la incompatibilidad mediada por HIJ (*incA* en P-1); de hecho, se ha demostrado que cualquiera de las repeticiones BCDD'D'EFGHIJ podía manifestar incompatibilidad frente al replicón RepFIB de P307 (Saul *et al.*, 1989).



**Figura 1.5.-** Modelo del control de la replicación del plásmido P1. Una única copia del plásmido inicia la replicación rápidamente (A). Cuando se producen dos copias (B), estas se aparean inmediatamente de forma antiparalela (C), bloqueando el origen de replicación hasta que la partición (D) reinicia el ciclo. Debajo se ilustra un esquema del ciclo celular, en el que en abcisas se representan la duración del ciclo celular y en ordenadas la probabilidad de que ocurra la iniciación.. Únicamente se produce un proceso de iniciación por cada ciclo celular, puesto que la replicación está autobloqueada y sólo es puesta en marcha después de la partición. El *locus incA* y el origen están representados por cuadrados negros y sombreados respectivamente. Las pequeñas flechas verticales señalan la orientación del gen *repA*.

### 1.3.2.- Sistema de resolución de multímeros.

Los sistemas de resolución de multímeros contribuyen de forma importante a la estabilidad de una serie de plásmidos de alto y bajo número de copias y han sido caracterizados en ColE1 (constituido por un sitio en *ois*, *cer*, donde actúa *xer*, recombinasa codificada por el hospedador) (Stirling *et al.*, 1988), P1 (el sitio *loxP* y la recombinasa Cre) (Austin *et al.*, 1981) y F (el sitio *rsfF* y el producto del gen D) (Lane *et al.*, 1986). También se han encontrado funciones de

resolución en CloDF13 (Hakkaart1984), RP4 (Roberts y Hillier, 1990) y RK2 (Grindley y Reed, 1985). Se piensa que el mecanismo por el que estos sistemas proporcionan estabilidad no es más que el aumento en el número de moléculas plasmídicas disponibles para su segregación en el momento de la división celular.

Krause y Guiney (1991) descubrieron este sistema de mantenimiento en el plásmido de virulencia de *S. dublin* al observar que la delección de un fragmento del mismo, localizado *downstream* de la región de virulencia, conducía a su inestabilidad y a la formación de multímeros. La estabilidad y monomerización eran restauradas mediante la inserción de Tn1725, transposón relacionado con Tn3, que codificaba una función de resolución sitio-específica. De esta forma se identificó un sistema de resolución de multímeros, de gran eficacia en el mantenimiento de la estabilidad plasmídica, compuesto por el gen de una resolvasa que actuaba en *trans*, *rsd*, y por un sitio de resolución en *cis*, *crs*. La secuencia de ambos mostraba una alta homología con el correspondiente loci de resolución de multímeros del plásmido F.

El gen de la resolvasa del plásmido de virulencia de *S. dublin* forma parte de una unidad multicistónica junto con al menos otros dos genes de función desconocida. Codifica para una proteína de 260 aminoácidos y 28.7 kD casi idéntica a la proteína D, recombinasa del plásmido F. Su región C-terminal tiene una gran homología con los dominios conservados de las recombinasas sitio-específicas de la familia de las integrasas que juegan un papel muy importante en la unión al DNA durante la ruptura de la cadena de DNA y su posterior unión (Argos *et al.*, 1986).

El *crs* está localizado *upstream* del gen de la resolvasa y contiene ocho repeticiones incompletas directas de 17 pb seguidas de un fragmento con varias repeticiones indirectas ricas en GC, homólogas estas últimas a la secuencia *rfsF* situada en *oriV1* de miniF, si bien no están implicadas en funciones de replicación. Puesto que el intercambio de cadenas en el proceso de recombinación del plásmido F ocurre en la secuencia *rfsF*, estos autores han especulado con que la recombinación tiene lugar en la correspondiente secuencia del plásmido de *S. dublin*, *crs*.

Como se comentó con anterioridad, la función estabilizante de este sistema se debe únicamente a su capacidad para resolver multímeros y puesto que la formación de multímeros es más probable que ocurra en cepas *recA*<sup>+</sup>, el efecto estabilizante será más pronunciado en este tipo de cepas. La resolvasa se unirá a las secuencias *crs* de los multímeros formados y por recombinación sitio-específica regenerará los monómeros.

En cuanto a la distribución de este sistema de resolución de multímeros entre los distintos serovares de *Salmonella*, Krause y Guiney (1991) detectaron su presencia en todas las cepas poseedoras del plásmido de virulencia que estudiaron, concretamente los serovares *S. typhimurium*, *S. choleraesuis* y *S. gallinarum* además de *S. dublin*, no encontrándolo en ninguna de las estirpes que carecían de él.

### 1.3.3.- Sistemas de partición.

Los sistemas de partición van a ser de vital importancia para el estable mantenimiento de plásmidos de bajo número de copias puesto que van a controlar el reparto de las moléculas plasmídicas en el momento de la división celular. Para algunos plásmidos, aun cuando en su mantenimiento se vean ayudados por alguno de los sistemas anteriormente citados, la necesidad de la actuación de un sistema de partición es indispensable. Así, varios tipos de plásmidos de *E. coli* están presentes en un número de copias tan bajo que se aproxima al de una copia por célula y aún así son mantenidos de forma estable. Estos plásmidos deben hacer uso de un sistema de partición activo que de alguna manera es análogo a la segregación mitótica de los cromosomas de las células eucarióticas.

Estos sistemas de partición, para ser considerados como tales, deben ser capaces de estabilizar replicones heterólogos. También deberían actuar como determinantes de incompatibilidad. En la mayoría de los casos, dos plásmidos que compartan el mismo sistema de partición se interferirán mutuamente en el adecuado reparto de las copias y por tanto serán incompatibles entre sí.

La clonación de fragmentos de DNA de F (Ogura *et al.*, 1983), pSC101 (Meacock y Cohen, 1980), P1 (Austin y Abeles, 1983b) y R1 (Gerdes *et al.*, 1985) capaces de impedir la pérdida de los replicones de dichos plásmidos confirmó la presencia de *loci* de partición en los mismos.

Los genes que codifican tales funciones reciben diversas denominaciones, siendo los más estudiados los genes *par* del bacteriófago P1 (Nordstrom *et al.*, 1980) que junto a los genes *sop* del plásmido F (Ogura *et al.*, 1983) constituyen la familia *sop/par* (Williams y Thomas, 1992) y los *stb* del plásmido NR1 (Miki *et al.*, 1980) que junto al *parA* del plásmido R1 conforman la familia de partición IncFII..

La organización genética de esta región es similar en los distintos plásmidos que disponen de ella. Basicamente consta de dos genes que codifican proteínas esenciales que actúan en *trans*, y un lugar situado en *cis* con respecto a los genes anteriores. Estos genes actúan independientemente de los sistemas de control de la replicación puesto pueden ser intercambiados con los genes de otros sistemas de partición sin perder su función (Gerdes y Molin, 1986). La principal diferencia entre los *loci* de partición de estos plásmidos radica en la posición de estos lugares en *cis* en relación a la de estos genes. Así mientras que en F y P1 este lugar en *cis* se encuentra downstream de los genes, en NR1 (donde reciben el nombre de *stb*) y en R1 (aunque este dispone unicamente de un único gen, *parA*) se encuentra upstream, lo cual puede suponer alguna diferencia en cuanto a su función y regulación (Tabuchi *et al.*, 1992).

Uno de los genes de la región de partición tanto del plásmido F como de P1 codifica para una proteína de alrededor de 44 kD que en el primero recibe el nombre de SopA y en el segundo de Par. Ambas están implicadas en una actividad represora de su propio promotor que es

incrementada por la presencia del producto del segundo gen de la zona de partición, SopB o ParB. Aunque no se ha detectado una implicación directa de ParA en el proceso de partición, existen evidencias genéticas de que la actividad reguladora no es su único papel. Mutaciones en *parA* no son complementadas por plásmidos que únicamente contengan *parB* expresado desde un promotor heterólogo, sino que requieren también la presencia de ParA (Friedman y Austin, 1988). En ParA se ha detectado una actividad ATPásica que aumenta en presencia de ParB (Davis *et al.*, 1991) y que pueda que sea la suministradora de parte de la energía necesaria para el proceso de partición (Davis *et al.*, 1992, Williams y Thomas, 1992).

SopB y ParB, proteínas de 35-38 kD, se unen a sus respectivas secuencias centroméricas (Mori *et al.*, 1989, Davis y Austin, 1988). SopB se ha encontrado asociada a membranas, por lo que se piensa que este tipo de proteínas es el nexo de unión entre el plásmido y el sitio del hospedador asociado a la membrana implicado en la partición.

Austin y Abeles (1983a), realizando estudios en el profago P1, propusieron la existencia dentro de la zona *par* de una secuencia que sería un análogo funcional de las secuencias centroméricas de los cromosomas eucarióticos. De acuerdo con esta teoría, la secuencia actuaría como un sitio de unión que sería reconocido por un hipotético aparato mitótico celular, probablemente una región especializada de la membrana celular, que movería a las moléculas plasmídicas hijas hacia polos opuestos de la célula en división. Dicha secuencia de reconocimiento fue denominada *incB* y observaron que ejercía un fuerte efecto de incompatibilidad.

Posteriormente, Martin *et al.* (1987) definieron dentro de *incB* una secuencia de 49 pb, *parS*, que era la que verdaderamente ejercía este papel de análogo centromérico. Davis y Austin (1988) restringieron aun más la longitud de esa secuencia centromérica *parS* a 35 pb y propusieron la necesidad de la unión a la misma de la proteína ParB para que dicha secuencia pudiera ser reconocida por el presunto aparato mitótico celular.

En P1 el sitio de partición, *parS* consiste en dos secuencias palindrómicas perfectas de 13 pb cada una, separadas por un espaciador de 3 pb y en dos secuencias de 4 pb ricas en AT flanqueando a los palíndromos (Austin, 1988). Tanto en la zona de las secuencias palindrómicas como a la izquierda de la misma se disponen varios sitios de unión de la proteína ParB, existiendo un único sitio de unión de la proteína del hospedador IHF (Figura 1.6)

No obstante, se ha determinado mediante mutaciones puntuales que únicamente una secuencia de 22 pb constituida por la parte izquierda del palíndromo y algunas bases adyacentes es suficiente para conseguir una efectiva partición, estando tanto la región situada inmediatamente a la izquierda de esas 22 pb como el resto de la secuencia que incluye el palíndromo de la derecha, implicados únicamente en funciones de incompatibilidad (Martin *et al.*, 1991).

Dentro de ese mínimo sitio de partición de 22 pb, las 15 primeras bases contienen dos de las repeticiones invertidas que constituyen la secuencia consenso propuesta como lugar de unión de

ParB, 5'-ATTTCAC-3' (la primera repetición tiene una A en la última base). Las 7 bases restantes deben contener alguna información importante para la partición, puesto que alteraciones en dicha secuencia suponen la eliminación de la actividad del sitio de partición. Además, mutaciones en esta secuencia conducen a defectos no sólo en la partición sino también en la capacidad de ejercer incompatibilidad. En *E. coli* la región equivalente, *sopC*, es algo más compleja, y consta de 12 repeticiones de 43 pb en tandem con una repetición invertida de 7 pb en cada unidad de 43 pb, aunque si bien todas ellas son necesarias para ejercer incompatibilidad, parece que únicamente una de las secuencias es requerida para una efectiva partición (Lane *et al.*, 1987).

Con respecto a los productos codificados por genes del hospedador implicados en el proceso de partición, es importante destacar el ya mencionado IHF o factor de Integración del hospedador (Funnell, 1991). Es una proteína de unión a DNA sitio-específica que en *E. coli* participa en una gran variedad de procesos que incluyen recombinación, replicación y transcripción, así como en la partición del plásmido P1. El lugar de unión de IHF se ha cartografiado en una región aneja al mínimo lugar de partición *parS*, e incluye la secuencia TAACTGACTGTTT que únicamente difiere de la consenso en dos posiciones (Figura 1.6). Por otra parte se ha visto, que IHF induce un fuerte plegamiento en el DNA en su sitio de unión.

En cuanto a la regulación, parece que la autorregulación de la síntesis de las proteínas Par es una característica común de los sistemas de partición. Los marcos abiertos de lectura en P1 están dispuestos como un operón bajo el control de un promotor situado justo por encima de *parA*. La síntesis de ParA y de ParB es autorregulada a nivel de transcripción (Friedman y Austin, 1988). ParA inhibe por sí sola la expresión de los genes *par*, siendo su forma más activa de unión al DNA

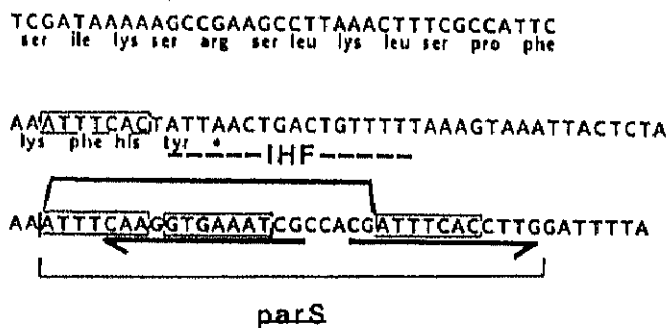


Figura 1.6.- Secuencia del locus *incB* de P1. Se incluye el extremo 3' del marco abierto de lectura de *parB*. Las secuencias enmarcadas son copias de ATTTCAC (menos una de ellas cuya última base es una A) que constituyen los lugares de unión de ParB. ParB protege estas secuencias junto con otras bases de alrededor en experimentos de *footprinting*. Se indica, mediante una llave de trazo fino, el sitio de partición *parS* con los dos palíndromos perfectos de 13 pb (indicados por flechas), y mediante otra de trazo grueso, la secuencia mínima de 22 pb necesaria para que se produzca la partición. La localización del lugar de unión de IHF aparece señalada en línea discontinua.

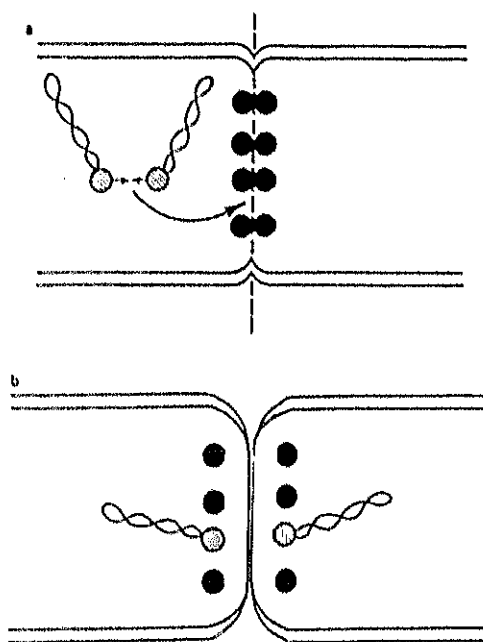


la dimérica. Para adoptar esta conformación más activa requiere la presencia de ATP (Davey y Funnell, 1994). ParA en combinación con ParB inhibe aún más la expresión, aunque ParB no tiene actividad represora por sí sola. Es probable que ambas proteínas se unan al palíndromo imperfecto de 20 pb que abarca la región situada entre el promotor de *parA* y el lugar de unión a ribosomas, puesto que mutaciones en dicha secuencia conducen a la transcripción constitutiva de los genes *par* (Friedman y Austin, 1988). Davis *et al.* (1992) han propuesto que ParA ejerce su actividad autorreguladora bloqueando el acceso al promotor mediante su unión a un gran palíndromo rico en AT situado en dicha zona, siendo esta unión altamente cooperativa y dependiente de ATP. En F el control es similar si bien SopA no es dependiente de ATP. La autorregulación posiblemente sirve para limitar la concentración de estas proteínas dentro de unos límites muy definidos, lo cual es un requerimiento vital para que se produzca una adecuada partición. Se ha visto que la sobreproducción de cualquiera de ellas bloquea la función de partición. Parece probable que la estequiometría de cada uno de los componentes que intervienen es crítica para el apropiado ensamblaje de las estructuras requeridas para que produzca el correcto reparto de las moléculas plasmídicas.

En cuanto a los modelos desarrollados para explicar el proceso de partición, hay que destacar el propuesto por Austin (1988). En él, dicho proceso comenzaría con la unión de ParB (o SopB en el caso de F) a las secuencias en *cis parS* de los plásmidos presentes. Estas proteínas, con capacidad de unirse a secuencias específicas del DNA, se asociarían a las copias del plásmido que se encontraran libres en la célula y facilitarían el emparejamiento plasmídico en virtud de una interacción específica proteína-proteína. Las parejas de plásmidos serían entonces capaces de unirse a uno de los varios lugares equivalentes de un posible aparato mitótico, como podría ser el naciente *septum* de la célula en división. El progresivo crecimiento en esa zona de la pared bacteriana y la consiguiente formación del *septum* celular ocurriría entre la pareja de plásmidos unida a esa zona, dirigiendo activamente a cada uno de los miembros de dicha pareja a cada célula hija (Figura 1.7). Aunque, como se mencionó anteriormente, no se ha encontrado hasta ahora una implicación directa de ParA en el proceso de partición, es probable que ParA (o SopA) desempeñe su función en una fase posterior a ParB, quizá en el reconocimiento de las parejas de plásmidos por la maquinaria mitótica. Hay que destacar que varios segmentos de la proteína ParA de P1 son muy similares a sus equivalentes en SopA de F (Mori *et al.*, 1986). Estas secuencias peptídicas podrían representar un dominio común para el reconocimiento del aparato del hospedador. Este modelo propuesto por Austin (Austin, 1988) ayudaría a explicar la incompatibilidad existente entre plásmidos del mismo grupo, puesto que un plásmido entrante con el mismo tipo de sitio de partición podría participar en el emparejamiento con el residente, ocasionando un reparto al azar de uno de los plásmidos con respecto al otro. Plásmidos compatibles tendrían sitios de partición con diferentes especificidades que únicamente permitirían el emparejamiento con los de su propia clase. Estas parejas de plásmidos se unirían a los sitios

comunes de unión de parejas de plásmidos del hospedador. Por tanto, se podría producir la segregación de dos o más tipos de plásmidos compatibles aun cuando hagan uso del mismo tipo de lugar de unión del hospedador.

Este modelo también explicaría la alteración de las propiedades de incompatibilidad que experimentan los sitios de partición cuando las secuencias que les rodean son eliminadas. Así, la delección de una pequeña región situada en la parte izquierda del sitio de partición de P1 (contigua a las 22 pb comentadas anteriormente) da lugar a un sitio que todavía es efectivo en la partición pero que ya no es reconocido como idéntico al original. Por tanto se habría alterado el mecanismo que reconoce a los sitios de partición como propios. Si se aplica este modelo a este caso, los sitios de partición delecionados sólo se emparejarían con sus iguales y habrían perdido la capacidad de emparejarse con los inalterados (Martin *et al.*, 1987). La explicación que proponen estos autores se fundamenta en que los pares de bases adicionales al mínimo sitio de partición contienen un sitio de unión específico para una proteína del hospedador (IHF) y un lugar adicional de unión de ParB (Davis y Austin, 1988). La unión de estos factores a esas bases adicionales alteraría la topología de todo el sitio de partición (por un plegamiento) de forma que dicho sitio solo podría emparejarse con sitios que se encontraran con la misma conformación y no con aquellos que, por no tener esas secuencias adicionales, no estuvieran unidos a la proteína del hospedador IHF y a otra molécula de ParB adicional. Cuando se encuentran en la misma célula plásmidos con el sitio



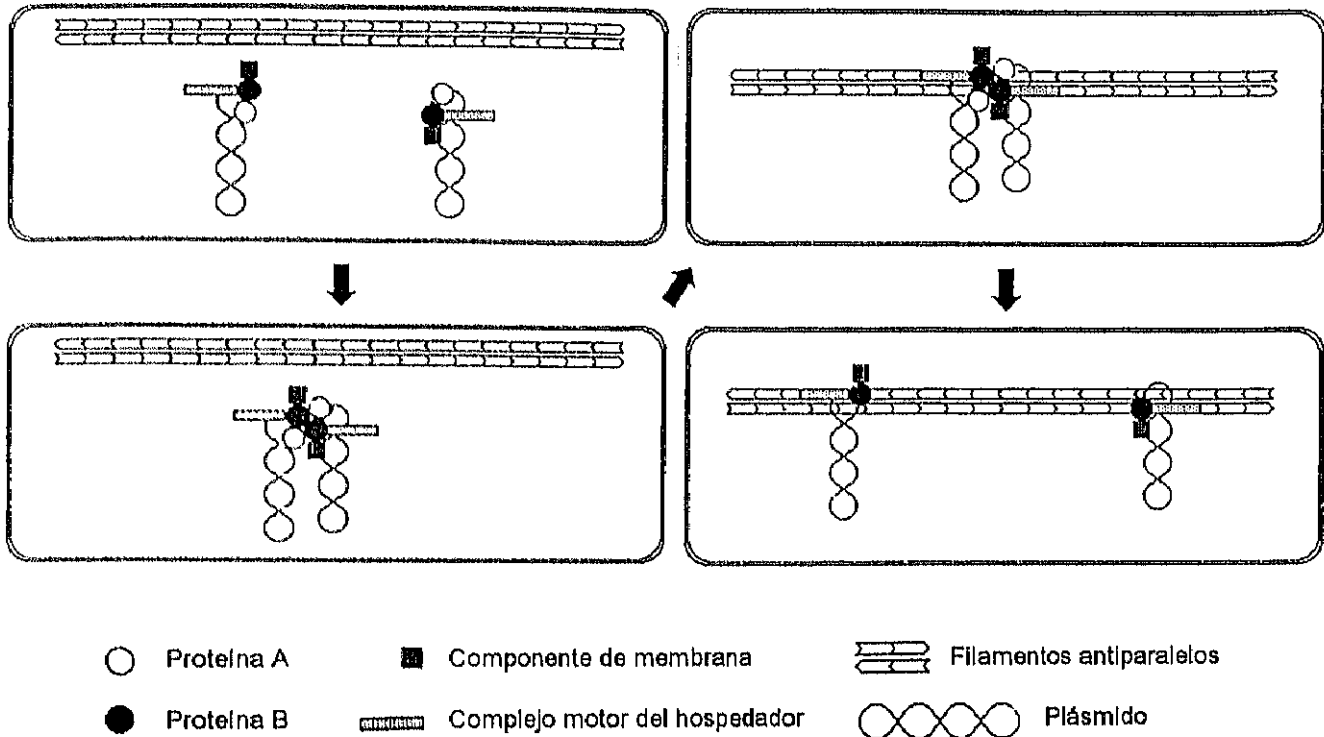
**Figura 1.7.-** Modelo de partición plasmídica (Austin, 1988). (a) Después de la replicación, las proteínas Par (círculos sombreados) se unirían al sitio de partición plasmídico y formarían un complejo de reconocimiento. Estos complejos formarían dímeros, los cuales se unirían a determinados lugares del hospedador (círculos negros). (b) El crecimiento y la formación del septum en el centro de la célula separaría esos lugares de unión del hospedador para los dímeros, lo que provocaría a su vez la separación de las copias del plásmido.

de partición íntegro y delecionado, la unión de los emparejamientos de los mismos al presunto aparato mitótico daría lugar a un adecuado reparto de ambos tipos por el mecanismo anteriormente mencionado (Figura 1.7). IHF colabora pues activamente, junto con ParB, en el emparejamiento de los plásmidos a la altura del lugar centromérico *parS*. En mutantes de *E. coli* carentes de este factor se restablece la capacidad de emparejamiento entre los sitios de partición íntegros y los delecionados. Parece ser que en ausencia de IHF no se produce la alteración topológica del sitio de partición original de forma que estos se comportan como si estuvieran delecionados.

Otros autores (Williams y Thomas, 1992) han propuesto otro modelo estudiando mutantes defectivos en la partición del cromosoma, concretamente los mutantes *muk*. Estos mutantes son capaces de replicar su DNA y de dividirse normalmente pero no pueden segregar las copias de sus cromosomas dando lugar a células anucleadas. La mutación *mukB* se produce en un gen cuyo producto tiene homología con proteínas del citoesqueleto, incluyendo la enzima asociada a los microtúbulos, dinamina. Otra proteína descubierta en *E. coli* tiene homología con la cadena pesada de la miosina de levadura. El descubrimiento de estas proteínas homólogas a los "motores" eucarióticos sugiere que pueden conducir el movimiento del nucleóide mediante un hasta el momento desconocido sistema de filamentos unidos o asociados a la membrana celular. Los motores eucarióticos se mueven unidireccionalmente por filamentos polares (actina o microtúbulos). Puesto que la partición es un mecanismo inherentemente simétrico, los presuntos filamentos bacterianos deberían hallarse orientados en ambas direcciones si es que son análogos a los descritos en eucariotas. La unión de los cromosomas replicados a cada uno de los pares de filamentos permitiría a los mismos moverse en direcciones contrarias.

Un modelo de este tipo podría ser aplicado a alguno de los sistemas de partición existentes. Este mecanismo de separación de moléculas hijas proporcionaría un sencillo procesamiento de los emparejamientos de plásmidos que ocurre en la primera fase del proceso de partición. Asumiendo que las parejas de plásmidos podrían asociarse con los filamentos antiparalelos en prácticamente cualquier punto de los mismos, ello haría posible que un gran número de plásmidos diferentes pudieran utilizar un mismo aparato sin interferir unos con otros. Esta asociación podría ocurrir de diversas maneras y dependería de las proteínas del hospedador así como de las constituyentes de los filamentos. Por tanto el hospedador proporcionaría el motor que guiaría el movimiento mientras que el plásmido únicamente proporcionaría las bases para el emparejamiento, asociación a los filamentos y su separación entre sí. Después de la asociación a los filamentos antiparalelos, las parejas de plásmidos se separarían por un cambio conformacional en el complejo como resultado de la fosforilación catalizada por la actividad ATPásica de las proteínas A. El movimiento a lo largo de los filamentos implicaría bien un movimiento del motor en relación a los mismos, o bien un movimiento de los filamentos con respecto a la célula. En la figura 1.8 se detalla el mecanismo en que el complejo de partición, compuesto por la proteína A (ParA, SopA

etc) y la proteína B (ParB, SopB, etc) posiblemente unidas a un componente de la membrana y a un motor sintetizado total o parcialmente por el hospedador, iniciaría el emparejamiento específico entre moléculas plasmídicas. Los plásmidos emparejados se unirían entonces a los filamentos antiparalelos anclados en la membrana celular. La hidrólisis del ATP por la proteína A provocaría la separación de los plásmidos que serían conducidos a los extremos opuestos de la célula.



**Figura 1.8.-** Modelo de partición plasmídica según Williams y Thomas (1992) (explicación en el texto).

#### 1.3.3.1.- Sistema de partición del plásmido de *Salmonella*.

Los sistemas de partición estudiados hasta ahora se engloban en dos familias: la de los IncFII y la de aquellos que tienen homología con los genes *sop* de F y *par* de P1. Los genes de partición de los plásmidos de virulencia de *Salmonella*, constituirían una tercera familia o podrían formar parte de una de las anteriores cuando estén lo suficientemente caracterizados. Si bien existe una evidente similitud funcional, no se ha detectado homología, mediante ensayos de hibridación, con otros sistemas de partición.

Estudiando las funciones de incompatibilidad del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* Cerin y Hackett (1989) localizaron uno de los genes de la región *par*, además de las regiones *incR* e *incL* (la equivalente a *parS*). Poco después y basándose en la correlación existente entre incompatibilidad y sistemas de partición (Novick, 1978), Tinge y Curtiss (1990a) localizaron los dos

genes, *parA* y *parB*, que forman parte de dicha región en el mismo serovar. Esta región va a expresar las funciones de incompatibilidad y de partición del plásmido de virulencia de *Salmonella* y se encuentra dentro de la zona definida como *repA* por Michiels *et al.* (1987).

A diferencia de la región de partición del plásmido F, la región de partición del plásmido de virulencia de *Salmonella* se encuentra alejada de los dos orígenes de replicación y se asemeja a la disposición de la región de partición del plásmido NR1 en el que las regiones *par* y *rep* se encuentran separadas por una región de 28 kb. Esta región de partición a pesar de exhibir funciones de incompatibilidad no va a mostrar incompatibilidad u homología con los dos replicones del plásmido *repB* y *repC* lo cual demuestra que no va a ser una región de control del número de copias para *repB* o *repC* (Tinge y Curtiss, 1990b).

Cerlin y Hackett (1993) han secuenciado esta región *par*, que queda englobada en un fragmento de 4.3 kb, y a la que han denominado *parVP* (*par* Virulence Plasmid). En ella han situado los dos genes englobados por esta región, *parA* y *parB*, los cuales tienen una gran homología con las secuencias de los genes *par* de otros plásmidos. Lo mismo ocurre con la secuencia de las proteínas. *parA* codifica para una proteína de 40 kD y *parB* para una de 32.5 kD. A continuación de *parB* existe una secuencia análoga a *parS*, lugar que, como se comentó anteriormente, en el plásmido P1 se piensa que actúa de forma semejante a un centrómero y que Cerlin y Hackett (1989) denominaron *incL* puesto que estaba implicada en incompatibilidad. Estos mismos autores definieron un nuevo locus de incompatibilidad *incR*, situado *upstream* de *parA*, dentro del cual existe una secuencia de DNA que puede adoptar una estructura de horquilla. La localización de *incR* recuerda a la de *incA* del plásmido R1, secuencia en *cis* con respecto a la del gen *parA* y necesaria, junto con el producto de dicho gen, para la estabilización del plásmido. No obstante ni *incR* se halla situada en el promotor de *parA* (como si lo está *incA*) ni existe ninguna similitud entre ambas secuencias (Figura 1.9).

Por otra parte, es necesaria la presencia de ambos loci, *incL*(*parS*) e *incR*, para determinar incompatibilidad, puesto que la falta de alguno de ellos hace perder ese fenotipo.

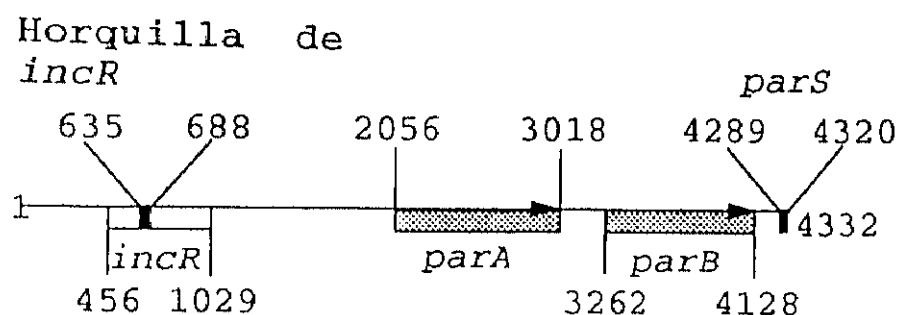
El plásmido de virulencia de *Salmonella* expresa dos sistemas de partición relacionados. Uno es el sistema de partición convencional, (Austin 1988, Williams y Thomas, 1992) en el que intervienen *parA*, *parB* y *parS*, que ya fue comentado con anterioridad. En el otro sistema en el que estarían implicados *parA* e *incR*. *ParA* interactuaría directa o indirectamente, pero sin la participación de *ParB*, con *incR*, y esta interacción contribuiría a la estabilidad del plásmido. Por tanto *ParA*, tanto en un sistema como en otro, va a ser imprescindible para el sistema de partición.

Otra característica interesante de esta región en el plásmido de virulencia de *Salmonella*, es que a diferencia de regiones *par* de otros plásmidos como P1, F o NR1, la transcripción de *parA* y *parB* es independiente, ambos genes poseen sus propios promotores.

Tinge y Curtiss (1990a) vieron que la incapacidad por parte de la región *parVP* de excluir a F-Kan (*IncFI*), R100 (*IncFII*), R726-1 (*IncH*), R64drd-11 (*IncI*) o R702 (*IncP*) así como la ausencia de

hibridación entre *parVP* y F, R100 o R726-1, indicaba que la función de incompatibilidad de *parVP* no estaba relacionada con la de estos plásmidos y situaría al plásmido de virulencia en un nuevo grupo de incompatibilidad.

Estos mismos autores mediante ensayos de hibridación, han detectado la región *parVP* en plásmidos de virulencia de *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum* y *S. pullorum*, si bien la hibridación con *S. dublin* fue muy débil (Tinge y Curtiss, 1990b).



**Figura 1.9.-** Esquema de la organización de las funciones de incompatibilidad y partición del plásmido de virulencia de *S. typhimurium*. El dibujo está hecho a escala y muestra los genes *parA* y *parB* (las flechas indican el sentido de la transcripción), y la región de incompatibilidad *parS*. El rectángulo abierto entre las bases 456 y 1029 delimita *incR*; dentro de esta región se encuentra una estructura en forma de bucle (635-688) señalada por un pequeño rectángulo negro (Cerin y Hackett, 1993).

# OBJETIVOS

Este trabajo supone el comienzo de una caracterización detallada del plásmido de virulencia de *S. enteritidis*. Se ha elegido este serovar por ser el mayor incidencia en España, y porque no se dispone de información sobre su plásmido de virulencia, a excepción de la región *spv*.

Los objetivos planteados son los siguientes:

1. Cartografiado del plásmido de virulencia.
2. Detección y localización de *loci* homólogos a algunos genes conocidos del plásmido de virulencia de *S. typhimurium*.
3. Estudio de las regiones responsables del mantenimiento del plásmido (replicación y partición).

Teniendo en cuenta el tamaño del plásmido (60 kb), los objetivos 1 y 2 se han realizado conjuntamente con José Manuel Rodríguez Peña, que se ha ocupado además de la construcción de los clones marcados como "pMJ".



## 2.- MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1.- Materiales.

### 2.1.1.- Medios de cultivo.

#### 2.1.1.1.- Medio LB (Luria Bertani).

Composición:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico	10 g
Agua destilada	1 l

Se ajustó el pH a un valor de 7 con NaOH 0,1 N y se esterilizó el medio en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera.

El medio sólido se prepara con 15 g/l de agar. En los casos en que se quiso detectar actividad  $\beta$ -galactosidásica, este medio se suplementó con el sustrato 5-Bromo-4-Cloro-3 indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal) hasta una concentración final de 50  $\mu$ g/ml y con el inductor isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 50  $\mu$ g/ml.

Cuando fue necesaria la adición de los antibióticos ampicilina y kanamicina estos se añadieron hasta una concentración final de 100  $\mu$ g/ml y 50  $\mu$ g/ml respectivamente.

#### 2.1.1.2.- Medio MacConkey.

Composición:

Peptona	20 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	2,5 g
Cloruro sódico	5 g
Rojo neutro	0,05 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	15 g

Se preparó a partir del correspondiente medio deshidratado de la casa ADSA-MICRO siguiendo las instrucciones del fabricante

### 2.1.2.- Marcadores de pesos moleculares de DNA.

Se emplearon los marcadores de pesos moleculares de DNA II, III y VI suministrados por la casa comercial Boehringer Mannheim.

**-Marcador de pesos moleculares II** (DNA del fago lambda digerido con *HindIII*).

Tamaño de los fragmentos: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125 pb.

**-Marcador de pesos moleculares III** (DNA del fago lambda digerido con *HindIII* y *EcoRI*).

Tamaño de los fragmentos: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 pb.

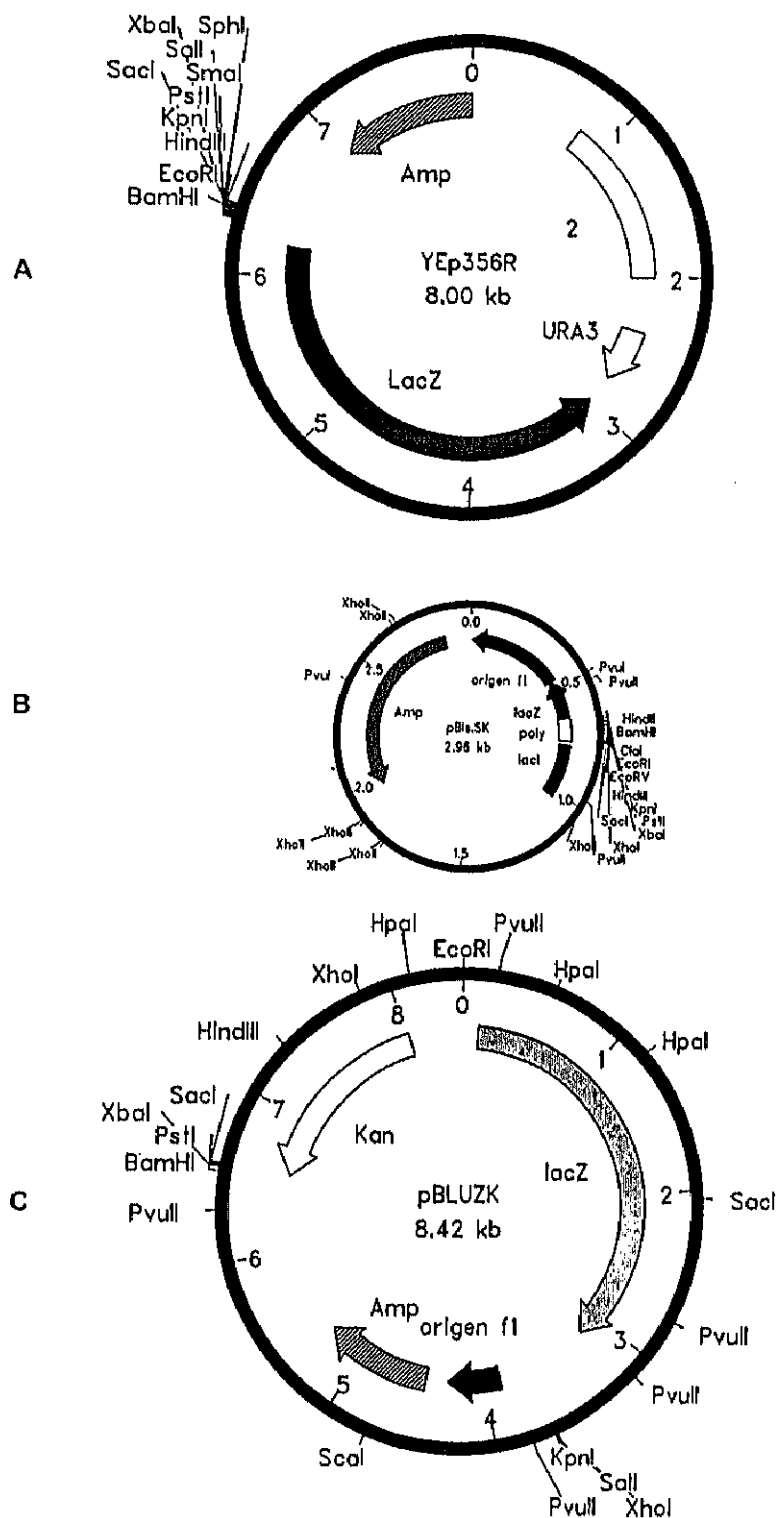
**-Marcador de pesos moleculares VI** (DNA del plásmido pBR328 digerido con *BglI* y DNA del plásmido pBR328 digerido con *HinfI*).

Tamaño de los fragmentos: 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220, 154 pb.

### 2.1.3.- Plásmidos.

Plásmido	Genotipo	Referencia
YEp356	<i>bla</i>	Myers <i>et al.</i> , 1986
YEp357	"	"
YEp358	"	"
YEp356R	"	"
YEp357R	"	"
YEp358R	"	"
pBluescript	"	Stratagene®
pBluzk	<i>bla</i> , <i>aph3'</i>	Ibáñez <i>et al.</i>

Los plásmidos YEp356R, YEp357R y YEp358R se han utilizado para aislar promotores de bacterias. Tienen dos orígenes de replicación: el del plásmido ColE1 de *E. coli*, y el del plásmido 2  $\mu$ m de *Saccharomyces cerevisiae* (inútil en este trabajo), así como marcadores de selección para ambos microorganismos. Contienen además la región estructural de gen *lacZ* de *E. coli* excepto los 7 primeros codones que han sido sustituidos por polylinkers con un elevado número de puntos de corte únicos para endonucleasas de restricción. Utilizando los tres plásmidos se puede insertar una secuencia de ADN en las tres fases de lectura con respecto a *lacZ* y generar así tres proteínas de fusión de las que una tendrá actividad  $\beta$ -galactosidasa, siempre y cuando el inserto contenga un promotor y un codon de iniciación. Los plásmidos YEp356, YEp357 y YEp358 poseen el *polylinker* en la orientación contraria (Figura 2.1).



**Figura 2.1.-** Mapa de restricción de los plásmidos (A) YEp356R, (B) pBluescript SK y (C) pBluzK.

## 2.1.4.- Cepas.

Cepa	Genotipo y dotación plasmídica	Referencia
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 thi leu rpsL lacY galK galT ara tonA thr tsx Δ (lac-proAB) F' (tra D36 proAB<sup>+</sup> Lac<sup>R</sup> lacZΔM15)</i>	(YanischPerron <i>et al.</i> , 1985)
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(φ80 lacZΔM15)recA1 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Stratagene <sup>®</sup>
<i>E. coli</i> V517	Contiene 8 plásmidos de tamaños: 54.2 kb, 7.2 kb, 5.6 kb, 5.1 kb, 3.9 kb, 3 kb, 2.7 kb y 2.1 kb.	(Macrina <i>et al.</i> , 1978)
<i>S.typhimurium</i> JR501	<i>hsdSA29 hsdSB121 hsdL6 trpC2 metA22 metE551 ilv452 leu3121 rpsL120 galE719 xyl-404 H1-b H2-e, n, x nmf<sup>+</sup> (Fels2) fla-66</i>	(Ryu y Hartin, 1990)

## 2.1.5.- Nomenclatura.

- En este trabajo se ha utilizado la nomenclatura tradicional de *Salmonella*, nombrando los serovares como si de especies se tratara. Así, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis aparece como *Salmonella enteritidis*.

## 2.1.6.- Soporte Informático.

- Banco de genes y proteínas EMBL-35, versión 1.15. EMBL Data Library, European Molecular Biology Laboratory.
- PC/GENE Sequence Analysis, IntelliGenetics.

## 2.2. - Métodos.

### 2.2.1.- Extracción de DNA plasmídico de *Salmonella*..

Se utilizó el método de Kado y Liu (1981).

2.2.1.1.- Cultivar el microorganismo en 3 ml de medio LB a 37°C con agitación durante 12 horas.

2.2.1.2.- Recoger las células por centrifugación durante 2 minutos a 3.600 rpm.

2.2.1.3.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 0,1 ml de TE.

2.2.1.4.- Lisar las células por adición de 0,4 ml de la solución de lisis (lauril-sulfato sódico al 3% en Tris-HCl 50 mM, pH 12.6) mezclando por inversión suave del tubo. Incubar a 60°C durante 20 minutos.

2.2.1.5.- Añadir 1 ml de fenol/cloroformo (v/v) y centrifugar a 13.000 rpm durante 15 minutos.

2.2.1.6.- Recoger la fase acuosa y proceder igual que en el punto anterior, centrifugando en esta ocasión 2 minutos.

2.2.1.7.- Tratar la fase acuosa con 1/2 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm, recoger la fase superior y eliminar los restos de fenol añadiendo 2 volúmenes de éter. Centrifugar 1 minuto y eliminar la fase superior.

2.2.1.8.- Precipitar el DNA con 0,10 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol, previamente enfriado, durante 20 minutos a -20°C.

2.2.1.9.- Centrifugar 15 minutos a 13.000 rpm. Lavar el precipitado con etanol al 70% y secar al vacío.

2.2.1.10.- Resuspender en 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 0,1 mM) o H<sub>2</sub>O.

### 2.2.2.- Extracción de DNA plasmídico de *E.coli*.

Se utilizó el método descrito por Birnboim y Doly (1979) con algunas modificaciones que se especifican a continuación:

2.2.2.1.-Cultivar la bacteria en 10 ml de LB, suplementado si es necesario con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37°C y con agitación.

2.2.2.2.- Recoger las células por centrifugación a 13.000 rpm durante 2 minutos.

2.2.2.3.- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 200 µl de la solución de lisis I. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

2.2.2.4.- Añadir 400 µl de solución de lisis II previamente enfriada, mezclar, por inversión suave del tubo, e incubar 5 minutos en hielo.

2.2.2.5.- Añadir 300 µl de solución de lisis III fría, mezclar, por inversión suave del tubo, y repetir la incubación anterior.

2.2.2.6.- Centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm y recoger el sobrenadante. Si quedan restos del precipitado centrifugar nuevamente en las mismas condiciones. Precipitar el DNA por adición de 500 µl de isopropanol, enfriando a -20°C, e incubando 10 minutos a temperatura ambiente.

2.2.2.7.- Centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 200 µl de TE. Añadir 200 µl de LiCl 5 M e incubar 5 minutos a -20°C.

2.2.2.8.- Centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm, recoger el sobrenadante y precipitar el DNA por adición de 2 volúmenes de etanol a -20°C y 0,1 volumen de acetato sódico. Incubar a -20°C durante 20 minutos y centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol al 70% enfriado a -20°C. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos, eliminar el sobrenadante y secar el DNA al vacío. Resuspender en 20 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 0,1 mM) o H<sub>2</sub>O.

Normalmente 1 µl de este preparado contiene el DNA suficiente para visualizarlo en un gel.

La técnica da buen resultado para plásmidos multicopia que no excedan las 20 kb de tamaño.

El método puede utilizarse a mayor escala:

Vol. cultivo	Solución I	Solución II	Solución III
50-100 ml	1 ml	2 ml	1.5 ml
200 ml	2 ml	4 ml	3 ml

La primera centrifugación se hace en estos casos a 12.000-15.000 rpm a 4°C durante 15 minutos.

**- Solución de lisis I**

Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl	25 mM pH 8.0

**- Solución de lisis II**

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Debe prepararse antes de su uso a partir de NaOH 2 N y SDS al 10%.

**- Solución de lisis III**

Acetato potásico	29,4 g
Acético glacial	11,5 ml
H <sub>2</sub> O	hasta 100 ml

### 2.2.3- Minilisis de colonias.

Este método se puede utilizar para el análisis de plásmidos multicopia.

2.2.3.1.- Repartir 40 µl de la solución de lisis en cada tubo eppendorf (tantos tubos como colonias se quieren analizar).

2.2.3.2.- Recoger las colonias de la placa de agar con un palillo estéril y resuspenderlas en la solución frotando contra la pared de tubo.

2.2.3.3.- Permitir la lisis durante 15 minutos a temperatura ambiente.

2.2.3.4.- Añadir 3  $\mu$ l de HCl 1 M y 5  $\mu$ l de colorante de electroforesis (si la solución se queda de color verde amarillento añadir solución de lisis hasta neutralizar el pH).

2.2.3.5.- Incubar 20 minutos a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

2.2.3.6.- Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm y poner las tubos en hielo.

2.2.3.7.- Cargar las muestras inmediatamente en un gel.

#### - Solución de lisis

Tris-HCl	10 mM, pH 8,0
EDTA	10 mM, pH 8,0
NaOH	100 mM
SDS	1%

Preparar tres soluciones madre: Tris-HCl + EDTA veinte veces concentrada, NaOH 1 N y SDS al 10%.

### 2.2.4.- Transformación de *E.coli* con $\text{CaCl}_2$ .

Se empleó el método de Mandel y Higa (1970).

#### 2.2.4.1.- Preparación de células competentes.

2.2.4.1.1.- Preparar un preinóculo sembrando una colonia en 2 ml de LB e Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación durante toda la noche.

2.2.4.1.2.- Inocular 50 ml de LB, en matraz de 250 ml (dilución 1:25). Crece a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación hasta alcanzar una  $\text{D}_{600\text{ nm}}$  entre 0,45 y 0,55.

2.2.4.1.3.- Enfriar en hielo durante 15 minutos. Centrifugar durante 10 minutos a 10.000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ . Eliminar el sobrenadante. Trabajar a partir de este momento a temperaturas de  $0-4^{\circ}\text{C}$ .

2.2.4.1.4.- Resuspender las células en una gota del sobrenadante y añadir 20 ml de  $\text{CaCl}_2$  30 mM enfriado en hielo. Incubar 15-20 minutos en hielo.

2.2.4.1.5.- Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos y a  $4^{\circ}\text{C}$ . Eliminar el sobrenadante.

2.2.4.1.6.- Resuspender el precipitado en 4 ml de  $\text{CaCl}_2$  100 mM y glicerol al 15%, previamente enfriado. Emplear una pipeta para resuspender las células. La incubación en hielo por unos minutos aumenta la competencia.

2.2.4.1.7.- Repartir la suspensión de células en alícuotas de 200  $\mu$ l y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido. Conservar a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



**2.2.4.2.- Transformación.**

2.2.4.2.1.- Descongelar las células competentes incubándolas en hielo durante 10-15 minutos.

2.2.4.2.2.- Añadir de 25  $\mu$ l de DNA (como máximo), 50  $\mu$ l de tampón de transformación, previamente enfriado, e incubar 25 minutos en hielo.

2.2.4.2.3.- Incubar 2 minutos a 37°C y 10 minutos a temperatura ambiente.

2.2.4.2.4.- Añadir 1 ml de LB e incubar durante 1 hora a 37°C con agitación.

2.2.4.2.5.- Sembrar en placas de LB agar, con el antibiótico correspondiente, a razón de 100  $\mu$ l de mezcla de transformación por placa como máximo.

**- Tampón de transformación**

Tris-HCl	10 mM, pH 7,5
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

**2.2.4.3.- Cálculo de la frecuencia de transformación.**

2.2.4.3.1.- Valorar la concentración del DNA. Preparar una dilución 1:200 o 1:100 del DNA en TE. Medir A<sub>260</sub> frente a TE. Calcular la concentración sabiendo que 1U de Absorbancia equivale a 50  $\mu$ g/ml.

2.2.4.3.2.- Transformar una cantidad conocida del DNA valorado.

2.2.4.3.3.- Contar número de transformantes obtenidos y calcular la frecuencia de transformación = nº de transformantes/ $\mu$ g de DNA.

**2.2.5.- Transformación a partir de colonias.**

Método de Hanahan (1985).

2.2.5.1.- Tomar 5 o 6 colonias con palillo estéril.

2.2.5.2.- Resuspender la colonias en 500  $\mu$ l de TFB.

2.2.5.3.- Incubar las células en hielo durante 10 minutos.

2.2.5.4.- Añadir el DNA, menos de 20  $\mu$ l, mezclar e incubar en hielo durante 10 minutos.

2.2.5.5.- Incubar durante 90 segundos a 37°C o 42°C.

2.2.5.6.- Sembrar en placa.

**- TFB**

K-MES pH 6,2	10 mM
CIRb	100 mM
Cl <sub>2</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O	45 mM
Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O	10 mM
Tricloruro de hexamina cobalto III	3 mM

pH final  $6,15 \pm 0,10$

- K-MES (2-(N-Morfolino) etanosulfonato potásico) 1 M Se prepara esta solución madre ajustando el pH a 6,3 con KOH, se esteriliza por filtración y se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.6.- Electroforesis en geles de agarosa.

Se realizó esencialmente según las técnicas descritas por Sambrook *et al.* (1989).

#### - Tampón de electroforesis TAE 50X

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml

#### Tampón de muestra 10X

Azul de bromofenol	0,1 %
EDTA	50 mM
Sacarosa (p/v)	50 %
SDS	0,01 %

Bromuro de Etidio (Sigma Chemical Co.) 10 mg/ml en tampón TAE. Se emplea a una concentración final de  $0,5 \mu\text{g/ml}$  que se incorpora al gel de agarosa o con la que se tiñe éste una vez finalizada la electroforesis.

### 2.2.7.- Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.

Las muestras de DNA se sometieron a electroforesis en geles de agarosa, empleándose para ello agarosa ultrapura, "Seakem GTG", suministrada por la marca comercial FMC Bio Products.

Para la electroelución del DNA se siguieron las indicaciones de los fabricantes del "Sephaglas Band Kit" (Pharmacia) y "GeneClean II" (Bio 101, Inc.).

### 2.2.8.- Determinación de tamaño, pureza y concentración de DNA.

#### 2.2.8.1.- Determinación de tamaño.

La determinación del tamaño molecular de DNA circular covalentemente cerrado se efectuó calibrando el gel de electroforesis con el patrón de plásmidos de tamaño conocido V517.

Para la determinación del tamaño molecular de DNA lineal se emplearon los fragmentos obtenidos por digestión con enzimas de restricción del fago lambda y/o del plásmido pBR325.

Se determinan los factores de migración de los patrones empleados obteniéndose posteriormente una recta de regresión definida por los logaritmos de esos valores y los logaritmos

de las masas moleculares correspondientes. A partir de esta recta de regresión se calcularon las masas moleculares desconocidas en base a su factor de migración en el gel.

### **2.2.8.2.- Determinación de la pureza.**

El índice de pureza se estimó midiendo la absorbancia (A) a 280 nm y a 260 nm y determinando la relación  $A_{280\text{ nm}}/A_{260\text{ nm}}$ , que para el DNA puro es de 1,8-2,0.

### **2.2.8.3.- Determinación de la concentración.**

La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm de una dilución en agua del DNA de 1/1000. Se considera que una densidad óptica de 1 equivale a 30 µg/ml para oligonucleótidos y 50 µg/ml para DNA de doble cadena.

## **2.2.9.- Tratamientos enzimático del DNA.**

### **2.2.9.1.- Digestión con endonucleasas de restricción.**

2.2.9.1.1.- Preparar la siguiente mezcla de reacción:

x µl	DNA (0,1-4 µg en H <sub>2</sub> O o TE)
2 µl	10X Tampón de restricción
18-x µl	H <sub>2</sub> O

20 µl de reacción es el volumen conveniente para el análisis de la restricción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa. La cantidad de DNA puede aumentarse o disminuirse manteniendo las proporciones de los demás componentes de la reacción.

2.2.9.1.2.- Añadir la endonucleasa de restricción en la proporción de 1- 5 U/µg de DNA, e incubar durante 1 hora.

1 U de enzima de restricción digiere completamente 1 µg de DNA en 60 minutos. Sin embargo, el DNA obtenido mediante procesos rápidos de extracción requiere o más cantidad de enzima o más tiempo de incubación. La cantidad de enzima debe ser menos de 1/10 del volumen final de la mezcla de reacción ya que el glicerol presente en el tampón de conservación del enzima puede interferir en la reacción.

La digestión del DNA con las distintas enzimas de restricción se efectúa con los tampones y a las temperaturas recomendadas por el fabricante (Boehringer Mannheim).

Si sólo se pretende analizar el DNA mediante electroforesis, la mezcla de reacción se carga directamente en el gel, después de haberle añadido el tampón de muestra. Si se va a realizar un tratamiento posterior, se inactiva la enzima por desproteinización con fenol y fenol/cloroformo.

### 2.2.9.2.- Tratamiento con fosfatasa alcalina.

La fosfatasa CIP (*Calf intestinal phosphatase*) cataliza la hidrólisis de residuos 5' fosfato de moléculas de DNA, RNA, ribo- y desoxiribonucleosidos trifosfato. Esta enzima requiere  $Zn^{2+}$  para su actividad y es inactivada por incubación a 70°C durante 10 minutos y/o extracción con fenol. Este tratamiento se empleó para eliminar los grupos fosfato de los extremos 5' del vector cortado con una única endonucleasa de restricción, evitando así su recircularización.

2.2.9.2.1.- Una vez digerido totalmente el DNA con la enzima de restricción, se elimina ésta por tratamiento con fenol/cloroformo y se precipita el DNA en las condiciones acostumbradas.

2.2.9.2.2.- Resuspender el precipitado en un volumen de 5 µl del tampón Tris-HCl 10 mM a pH 8.0. Añadir seguidamente el tampón de la fosfatasa CIP 10X, la fosfatasa CIP y completar con agua destilada desionizada estéril hasta un volumen final de 50 µl. Para la desfosfatización de extremos cohesivos se añade 1U de CIP/100 pmoles de DNA y se incuba en baño termostatzado a 37°C. La fosfatasa se añade en alícuotas y tras cada adición se incuba 15 minutos. De esta forma se contrarresta la inactivación parcial que sufre a esta temperatura. En el caso de extremos romos se añade 1U de CIP/2 pmoles de DNA, se incuba 15 minutos a 37°C al final de los cuales se añade otra alícuota de la enzima y se incuba a 55°C durante 45 minutos.

2.2.9.2.3.- Para detener la reacción añadir 40 µl de agua destilada desionizada, 10 µl de STE 10X y 5 µl de SDS al 10% (p/v), calentando a 68°C durante 15 minutos.

2.2.9.2.4.- Desproteinizar tratando la reacción dos veces con fenol/cloroformo y dos veces con cloroformo.

2.2.9.2.5.- Precipitar el DNA de la forma acostumbrada.

El factor de conversión que se utiliza es que 2 µg de un DNA lineal de 5 kb contienen 1,4 pmoles de extremos 5' fosfato.

#### - Solución STE 10X

Tris-HCl	100 mM, pH 8,0
NaCl	1 M
EDTA	10 mM

### 2.2.9.3.- Tratamiento con *Bal* 31.

*Bal* 31 tiene principalmente una actividad exonucleásica en 3', eliminando nucleótidos desde ambos extremos 3' de las dos cadenas de fragmentos lineales de DNA. Dicha actividad es totalmente dependiente de la presencia de calcio y por tanto puede ser detenida mediante la adición de agentes quelantes como EGTA o EDTA. Puesto que la degradación se produce de forma relativamente uniforme desde los extremos del DNA, la digestión con *Bal* 31 puede ser utilizada para la realización de mapas de restricción en fragmentos pequeños de DNA.

2.2.9.3.1.- Incubar el DNA plasmídico, en presencia de RNAsa, con una enzima de restricción que produzca un punto único de corte para obtener así DNA lineal.

2.2.9.3.2.- Eliminar dicha enzima mediante tratamiento con fenol/cloroformo y precipitar el DNA en las condiciones acostumbradas.

2.2.9.3.3.- Resuspender el DNA en 60  $\mu$ l de tampón de *Bal* 31 (0.06  $\mu$ g/ $\mu$ l) y dividirlo en 4 alícuotas.

**Tampón *Bal* 31:**

Tris-HCl	20 mM, pH 7.2 ( a 30°C)
NaCl	600 mM, pH 7.2 ( a 30°C)
MgCl <sub>2</sub>	12,5 mM
CaCl <sub>2</sub>	12,5 mM
EDTA	1 mM

2.2.9.3.4.- Añadir una unidad de enzima *Bal* 31 ( Boehringer Mannheim) (una unidad es la actividad enzimática que libera 600 pb en 10 minutos a 30 °C de DNA linearizado de pBR322) a tres de las alícuotas ( la cuarta es el control a tiempo cero) e incubarlas a 30 °C durante un tiempo de 30, 60 y 90 minutos respectivamente.

2.2.9.3.5.- Agregar 1.5  $\mu$ l de EDTA 0.2 M, pH 8 e incubar 2 minutos en hielo para parar la reacción.

2.2.9.3.6.- Precipitar el DNA, lavar con etanol 70% y resuspender en 15  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

2.2.9.3.7.- Finalmente las cuatro muestras se digieren con la enzima de restricción cuyos puntos de corte interese cartografiar.

## 2.2.10.- Purificación del DNA.

El primer paso para la purificación del DNA es la eliminación de proteínas mediante la extracción de la fase acuosa de ácidos nucleicos con fenol y/o cloroformo. La extracción se emplea siempre y cuando sea necesario eliminar o inactivar endonucleasas de restricción y fosfatasa alcalina empleadas con anterioridad, y cuando el DNA forma parte de una compleja mezcla de moléculas obtenidas tras la lisis celular.

2.2.10.1.- Tratar el DNA una vez con fenol, o una mezcla de fenol/cloroformo 1:1 (v/v), y posteriormente con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). La mezcla de fenol/cloroformo se utiliza por dos motivos. Primero porque es más eficiente la desproteinización, y segundo porque el fenol no inactiva completamente la actividad RNasa y es un solvente para las moléculas de RNA que contienen largas cadenas de poliA. La extracción final con cloroformo tiene como objeto eliminar los restos de fenol que permanecen en la preparación de ácidos nucleicos.

La solución de DNA se mezcla con un volumen igual de fenol, o fenol/cloroformo, hasta obtener una emulsión.

2.2.10.2.- Centrifugar a 13.000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente.

2.2.10.3.- Recoger la fase acuosa y repetir el proceso. Tratar el mismo número de veces con cloroformo, centrifugando en las mismas condiciones después de cada tratamiento.

2.2.10.4.- Eliminar los restos de cloroformo por adición de dos volúmenes de éter saturado con agua.

2.2.10.5.- Precipitar la solución de DNA con etanol.

### **2.2.11.- Ligación de fragmentos de DNA.**

Para la unión de los fragmentos de DNA se empleó la ligasa del bacteriófago T4 (Boehringer Mannheim). Esta enzima une extremos romos y cohesivos que poseen terminaciones 5' fosfato y 3' hidroxilo, requiriendo para su actuación ATP y  $Mg^{2+}$  y siendo inhibida por concentraciones de NaCl  $>150$  mM.

2.2.11.1.- Llevar a cabo la reacción en un volumen final de 10  $\mu$ l. La mezcla de reacción contendrá el vector linealizado, el fragmento de DNA a insertar (en una concentración molar doble o triple que la del vector), el tampón de ligación y la ligasa T4 DNA.

2.2.11.2.- Incubar la reacción a 12°C durante 16 horas para unir extremos cohesivos y a 23-26°C durante 4-6 horas para los extremos romos. En este último caso se utilizan de 10 a 100 veces más cantidad de enzima que para extremos cohesivos.

### **2.2.12.- Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa.**

Realizar previamente electroforesis en gel de agarosa a bajo voltaje (50-60 V). Finalizada la electroforesis hacer fotografía del gel colocando en sus laterales dos reglas.

2.2.12.1.- Tratar con HCl 0,25 N durante 10 minutos y con agitación suave. En este y los siguientes tratamientos el gel debe estar totalmente cubierto por las soluciones. Si el tamaño de los fragmentos a transferir es  $<1$  kb no es necesario tratar el gel con la solución de HCl, por el contrario, si es  $>10$  kb debe prolongarse el lavado durante 20 minutos.

2.2.12.2.- Lavar con  $H_2O$  destilada 5 minutos

2.2.12.3.- Desnaturalizar con NaCl 1,5 M, NaOH 0,5M, durante 5 minutos y con agitación suave. Repetir dos veces.

2.2.12.4.- Neutralizar con AcNa 3 M, pH 5,5, mediante tres lavados de 10 minutos cada uno.

La transferencia a membranas de nylon puede ser unidireccional o bidireccional. En nuestro caso sólo se empleó la bidireccional.

#### **2.2.12.1- Transferencia bidireccional.**

2.2.12.1.1.- Colocar de 7 a 10 cm de servilletas de papel de un tamaño algo superior al del gel.

2.2.12.1.2.- Colocar sobre ellas dos papeles Whatman 3 MM, del tamaño del gel, humedecidas en SSC 1X, y una membrana de nylon, también del tamaño del gel y humedecida en SSC. Delimitar la zona a transferir mediante papel parafilm situándolo en los extremos de la membrana de nylon.

2.2.12.1.3.- Colocar el gel evitando la formación de burbujas de aire. La transferencia es bidireccional por lo que sobre el gel se sitúa otra membrana de nylon, delimitando en este caso también la transferencia mediante la colocación de parafilm entre el gel y la membrana.

2.2.12.1.4.- Colocar dos papeles Whatman 3 MM humedecidos en el mismo tampón y servilletas, de la misma forma que antes pero situando sobre ellas un peso uniformemente repartido de 0,2 a 0,5 kg.

2.2.12.1.5.- Transcurridas 16 horas, desmontar el sistema y secar las membranas 1 hora a temperatura ambiente y 2 horas a 80°C en horno.

Las membranas secas se pueden guardar en bolsas de plástico con desecador de silicagel y selladas a vacío.

2.2.12.1.5.- Para comprobar que la transferencia ha sido correcta se observa el gel en transiluminador de luz UV, observando que ha desaparecido la mayor parte del DNA.

#### - Solución SSC 20X

NaCl	3 M
Citrato sódico	0,3 M

Ajustar el pH a un valor aproximado de 7 si es necesario. Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

### 2.2.13.- Hibridación de ácidos nucleicos.

Se empleó un procedimiento no radiactivo. Para ello se realizó el marcaje de la sonda con digoxigenina mediante el *DNA Labeling and Detection Kit Nonradiactive* (Boehringer Mannheim).

#### 2.2.13.1. - Fundamento de la técnica.

Los fragmentos de DNA empleados como sondas son marcados no radiactivamente por el procedimiento de "random priming". Se utiliza una mezcla de hexanucleótidos que hibridan al azar con la sonda (desnaturalizada previamente), y actúan como cebadores para la DNA polimerasa. En la reacción de polimerización se añade a la mezcla de desoxinucleótidos, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, un quinto marcado con digoxigenina. Estos hexanucleótidos van a funcionar como primers y a ellos se van a unir, utilizando como molde el DNA lineal de la sonda, una serie de desoxinucleótidos, dATP, dCTP, dGTP, dTTP a los que se va a añadir un quinto hexanucleótido marcado con digoxigenina, el DIG-dUTP. Los tres primeros van en idéntica proporción, mientras

que el dTTP y el DIG-dUTP suponen 2/3 y 1/3 respectivamente de las cantidades de los anteriores.

Después de la hibridación de la sonda marcada al DNA molde, los híbridos son detectados mediante inmunoensayo utilizando una enzima, la fosfatasa alcalina, ligada a un anticuerpo antidigoxigenina, que cataliza una reacción colorimétrica en presencia de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (X-P) y la sal de nitroazul-tetrazolio (NBT).

#### **2.2.13.2.-Marcaje de los fragmentos de DNA.**

2.2.13.2.1.- Los fragmentos de DNA empleados como sondas se purificaron por extracción con fenol y precipitación con etanol.

2.2.13.2.2.- Se desnaturalizó el DNA sonda por calentamiento a 95°C durante 10 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo.

2.2.13.2.3.- Se adicionó a un tubo eppendorf puesto en hielo:

-1µg de DNA sonda (5µl) desnaturalizado.

-2µl de mezcla de hexanucleótidos, 10x concentrada proporcionada por el Kit (*random primers*).

-2µl de una mezcla de dNTP's de marcaje 10x concentrada con dATP 1mM, dCTP 1mM, dGTP 1mM, dTTP 1mM, Dig-dUTP 0.35 mM, pH=6.5.

-H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 19µl.

-1µl del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I.

2.2.13.2.4.- Se incubó durante 16 horas a 37°C.

2.2.13.2.5.- Se detuvo la reacción por adición de 2µl de EDTA 0.2 M, pH=8.

2.2.13.2.6.- Se purificó el DNA marcado con digoxigenina por precipitación en un tubo eppendorf siliconizado, con 2.5 µl de LiCl 4M y 75 µl de etanol 98% frío (-20°C) y se precipitó a -70°C.

2.2.13.2.7.- Se centrifugó a 13,000 rpm. Se lavó con etanol 70% frío, se secó a vacío y se resuspendió en 50 µl de Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH=8.

A partir de 1µg de DNA molde habitualmente se obtienen 260 ng de DNA marcado de nueva síntesis.



### **2.2.13.3.- Prehibridación.**

#### **-Solución de prehibridación:**

- 25 ml de 20xSSC (NaCl 3M, citrato sódico 0,3M).
- 1.2 ml de 10xSDS.
- 5 g de reactivo bloqueante proporcionado por el Kit.
- 50 ml de formamida desionizada.
- 5 mg de esperma de salmón desnaturalizado 10 minutos a 100°C
- H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen de 100 ml.

La disolución del agente bloqueante requiere una calefacción suave.

2.2.13.3.1.- Se utilizaron 30 ml de la solución de prehibridación por cada 100 cm<sup>2</sup> de la membrana que contenía el DNA transferido.

2.2.13.3.2.- Se incubó la membrana a 42°C durante durante 1 hora. En algunos casos la incubación se realizó a 68°C no empleándose entonces la formamida en la solución de prehibridación.

### **2.2.13.4.- Hibridación.**

2.2.13.4.1.- Se eliminó la solución de prehibridación.

2.2.13.4.2.- Se preparó solución nueva (con la misma composición que la solución de prehibridación anterior pero sin el DNA de esperma de salmón) y se añadió la sonda marcada y desnaturalizada (100°C durante 10 minutos) a una concentración de 25 ng/ml.

2.2.13.4.3.- Se pusieron 4 ml de solución por cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana.

2.2.13.4.4.- Se incubó durante 18 horas a 42°C. En los ensayos en que no se empleó formamida ni en la solución de prehibridación ni en la de hibridación, la incubación se realizó a 68°C.

### **2.2.13.5.- Fase de lavado.**

2.2.13.5.1.- Se lavaron los filtros a temperatura ambiente con al menos 50 ml de 2xSSC, 0.1 % de SDS durante 5 minutos con agitación. Se repitió el proceso dos veces.

2.2.13.5.2.- Se volvieron a lavar los filtros a 68°C con al menos 50 ml de 0.1xSSC, 0,1% SDS durante 15 minutos con agitación. Se repitió el lavado dos veces.

### **2.2.13.6.- Detección inmunológica.**

2.2.13.6.1.- Se lavaron los filtros durante un minuto con la solución Tris-HCl 100mM, NaCl 150 mM, pH=7.5.

2.2.13.6.2.- Se bloquearon durante 30 minutos con 100 ml (para filtros de 100 cm<sup>2</sup>) de la solución anterior conteniendo el reactivo bloqueante al 0,5% agitando de vez en cuando.

2.2.13.6.3.- Se lavaron de nuevo 1 minuto con la solución del punto 3.15.5.1.-.

2.2.13.6.4.- Se incubaron en agitación durante 30 minutos y a temperatura ambiente con 20 ml de una solución de anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, a una concentración de 150 mU por ml (1:5000) de la solución, Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH=7.5.

2.2.13.6.5.- Se lavaron las membranas a temperatura ambiente con agitación durante 15 minutos con 100 ml de la solución Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH=7.5 para eliminar el anticuerpo conjugado no fijado.

2.2.13.6.6.- Se equilibraron los filtros durante 2 minutos con 20 ml de la solución Tris-HCl 80 mM, pH=9.5.

2.2.13.6.7.- Se incubaron los filtros, en ausencia de luz y durante un período de tiempo que osciló entre los 15 minutos y las 2 horas con la solución de sustrato cromogénico: 45 µl de NBT (sal de nitroazul tetrazolio) y 35 µl de X-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) en 10 ml de Tris-HCl 80 mM, pH=9.5, preparada inmediatamente.

2.2.13.6.8.- Cuando el color se consideró lo suficientemente nítido se paró la reacción por inmersión de las membranas en TE.

## 2.2.14.- Secuenciación automática del DNA.

Para la extracción del DNA se utilizó el kit *Qiagen* suministrado por Pharmacia, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

La secuenciación automática se realizó en el secuenciador *A.L.F. DNA sequencer* de la casa comercial Pharmacia LKB.

## 2.2.15.- Ensayo de estabilidad.

Este ensayo se utilizó para estimar la estabilidad de las construcciones plasmídicas realizadas.

2.2.15.1.- Transformar *E.coli* con el plásmido a estudiar.

2.2.15.2.- Sembrar algunas de las colonias aisladas obtenidas en tubos de 3 ml de LB durante 24 horas a 37°C con agitación.

2.2.15.3.- Inocular nuevos tubos de LB a partir de los cultivados anteriormente e incubarlos 24 horas en las mismas condiciones.

2.2.15.4.- Sembrar por extensión placas de LB sin antibiótico a partir de los tubos incubados el día anterior e inocular nuevos tubos de LB para incubarlos 24 horas de la misma forma que anteriormente.

2.2.15.5.- A partir de las placas de LB sembradas el día anterior, hacer 100 réplicas de las colonias aisladas en placas de LB suplementadas con el antibiótico para el que codifica resistencia el plásmido objeto de estudio (ensayo de 48 horas) e incubar a 37°C. Sembrar placas y tubos de LB sin antibiótico e incubarlos durante 24 horas en las condiciones ya citadas en el apartado precedente.

2.2.15.6.- Realizar 100 réplicas, a partir de las placas de LB sembradas el día anterior, en placas de LB suplementadas con el antibiótico correspondiente (ensayo 72 horas).

La estabilidad de los plásmidos se estimó calculando el porcentaje de colonias que habían crecido en medio selectivo en cada uno de los ensayos.

## 2.2.16.- Ensayos de incompatibilidad.

Con este ensayo se pretendía analizar la pertenencia o no de dos plásmidos a un mismo grupo de incompatibilidad.

2.2.16.1.- Transformar *E. coli* con uno de los plásmidos.

2.2.16.2.- Introducir, mediante transformación, el segundo plásmido seleccionando con el antibiótico para el que éste codifica resistencia.

2.2.16.3.- Para comprobar si se ha producido o no el desplazamiento de alguno de los plásmidos por incompatibilidad, cultivar las colonias aisladas (100 como mínimo) en LB agar con los antibióticos necesarios para seleccionar ambos plásmidos y determinar el porcentaje de colonias que crecen.

2.2.16.4.- Si se obtiene un porcentaje de crecimiento superior al 0% se procede de la siguiente manera: se cultiva una de las colonias en un matraz de 25 ml de LB durante 25 generaciones y se siembra en LB agar distintas diluciones para obtener colonias aisladas. Se resiembran al menos 100 colonias en dos placas de LB agar, cada una suplementada con uno de los dos antibióticos. Se calcula tanto el porcentaje de colonias que crecen en ambas placas como de las que crecen en alguna o ninguna de ellas. De aquellas colonias que crezcan en ambas placas se hace extracción de DNA para comprobar la presencia de los dos plásmidos.

## 2.2.17- Citometría de flujo.

Se llevaron a cabo estudios de citometría de flujo empleando la técnica del FDG.

Esta técnica emplea un sustrato fluorescente de la  $\beta$ -galactosidasa, la fluoresceína-di- $\beta$ -D-galactopiranosido (FDG), que en presencia de este enzima origina fluoresceína cuya emisión es detectada mediante Citometría de Flujo. Esta emisión es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la célula y, portanto, a la expresión del gen *lacZ* (Álvarez *et al.*, 1993)

2.2.17.1.- Cultivar el microorganismo en LB a 37°C durante toda la noche y con agitación moderada, para obtener un número de células similar a  $2 \times 10^9$  céls./ml.

2.2.17.2.- Recoger 100  $\mu$ l del cultivo, aproximadamente  $2 \times 10^7$  céls./ml.

2.2.17.3.- Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm y tirar el sobrenadante.

2.2.17.4.- Resuspender en 1,5 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

2.2.17.5.- Repartir en alícuotas de 500  $\mu$ l para dos ensayos paralelos:

- Control: Añadir 50  $\mu$ l de IP (Ioduro de propidio)

- Problema: Añadir 10  $\mu$ l de FDG y 50  $\mu$ l de IP

2.2.17.6.- Incubar a temperatura ambiente con agitación y en oscuridad 20 minutos como mínimo.

2.2.17.7.- Analizar en citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson)

En esta técnica el IP se emplea para discriminar células muertas.

**Solución de IP: 0,005% en H<sub>2</sub>O o en PBS**

**Solución de FDG:**

FDG 1 mg/ml	1 % DMSO (dimetilsulfóxido)
	1 % Etanol
	98 % H <sub>2</sub> O

## 2.2.18.- Amplificación de DNA por la técnica de P.C.R.

Para la amplificación del DNA se utilizó el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando un termociclador Perkin Elmer Cetus modelo DNA Thermal Cycler.

Mezcla de reacción	Volumen	Concentración final
H <sub>2</sub> O destilada estéril	csp 100 $\mu$ l	
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	8 $\mu$ l	2 mM
Tampón II PCRx10	10 $\mu$ l	1X
dGTP 10 mM	2 $\mu$ l	0,2 mM
dATP 10 mM	2 $\mu$ l	0,2 mM
dTTP 10 mM	2 $\mu$ l	0,2 mM
dCTP 10 mM	2 $\mu$ l	0,2 mM
Oligo d(T) 1	*	100 picomoles
Oligo d(T) 2	*	100 picomoles
DNA molde	⊗	<1 $\mu$ g/ 100 $\mu$ l

\* Según concentración del oligo d(T)

⊗ Según concentración del DNA molde

2.2.18.1- Para evitar la evaporación se adicionó a la mezcla de reacción 50  $\mu$ l de aceite mineral (Sigma Chemical Co.).

2.2.18.2- Se introdujeron los eppendorf con la mezcla de reacción en los pocillos del termociclador, agregando previamente a dichos pocillos unas gotas del mismo aceite mineral para facilitar la transferencia del calor.

2.2.18.3- Se procedió a la desnaturalización del DNA molde por calentamiento a 97°C durante 10 minutos.

2.2.18.4- Adición de 0.5 µl de *Taq* DNA polimerasa I de concentración 2.5 U / 100 µl

2.2.18.5- Ciclos de temperatura:

2.2.18.5.1.- Fase de desnaturalización :

Temperatura : 94°C

Tiempo : 30 segundos

2.2.18.5.2.- Fase de alineamiento :

Temperatura : 50°C (Depende de la temperatura de desnaturalización de los oligos)

Tiempo : 60 segundos

2.2.18.5.3.- Fase de síntesis :

Temperatura : 72°C

Tiempo\* : 60 segundos (Depende de la longitud del fragmento a sintetizar)

Estas tres fases, que constituyen un ciclo, se repitieron 30 veces.

2.2.18.6.- Ciclo final

Se realizó un último ciclo con una fase de desnaturalización y de alineamiento idéntica a la del apartado anterior pero con una fase de síntesis a 72°C pero que duró 10 minutos con el fin de rellenar zonas no sintetizadas en los anteriores ciclos.

2.2.18.7.- Por último se cargaron 5 µl de la reacción en un gel de agarosa para verificar que se había producido la amplificación.

## 2.2.19.- Determinación de la resistencia al suero.

2.2.19.1.- Cultivar el microorganismo en LB a 37°C con agitación, para obtener un número de células cercano a  $2 \times 10^8$  células/ml.

2.2.19.2.- Recoger las células de 1 ml del cultivo anterior por centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto.

2.2.19.3.- Resuspender las células en 1ml de PBS. Repetir la operación dos veces.

2.2.19.4.- Preparar varias diluciones decimales de la suspensión celular en PBS.

2.2.19.5.- Incubar a 37 °C durante 1 hora cada una de las diluciones anteriores de la suspensión celular con una cantidad determinada de suero humano normal e inactivado

(desprovisto de complemento) . Para inactivar el suero, este es sometido previamente a un calentamiento a 56 °C durante 30 minutos.

2.2.19.6.- Plaquear en LB agar.

2.2.19.7.- La sensibilidad al suero se calcula como la diferencia entre el logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias (CFU) obtenidas tras la incubación con suero inactivado y el logaritmo decimal de las obtenidas con suero normal (*log kill*).

#### **2.2.20.- Absorción del suero con suspensiones bacterianas.**

Se utilizó el método descrito por Catty y Raykundalia (1988).

2.2.20.1.- Se recogen por centrifugación las células de un cultivo en fase logarítmica que contenga aproximadamente  $10^8$  bacterias/ml.

2.2.20.2.- Se lavan las células con PBS para eliminar restos del medio de cultivo y se recogen por centrifugación.

2.2.20.3.- Se resuspenden en el suero problema hasta una concentración de  $10^8$  bacterias/ml de suero y se incuban durante 1 hora a 37 °C con agitación suave.

2.2.20.4.- Se eliminan las bacterias del suero mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,22  $\mu$ m.

## 3.- RESULTADOS

### 3.1.- Cartografiado del plásmido de virulencia de *S. enteritidis*.

#### 3.1.1.- Análisis y detección de plásmidos.

Para la realización de este trabajo se escogió al azar una cepa de *S. enteritidis*, de entre las suministradas por el 'Instituto de Salud Carlos III', con las condiciones de que albergasen un plásmido de virulencia de tamaño representativo (60 kb) y hubieran sido aisladas de muestras humanas durante un brote de gastroenteritis.

La cepa escogida, *S. enteritidis* 82139, fue aislada en 1986 de una muestra de heces. El plásmido de 60 kb de esta cepa se pudo detectar tanto por el método de Kado y Llu (1981) como por el de Birboim y Doly (1979) y se denominó pFM82139.

#### 3.1.2.- Clonación del plásmido pFM82139.

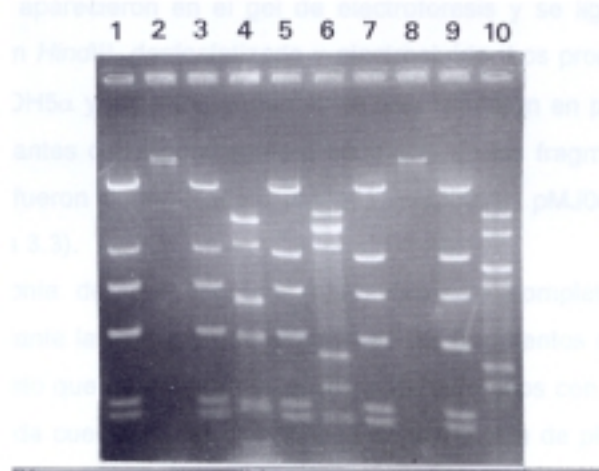
Se comenzó por realizar un análisis de restricción del plásmido con las enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Xba*I, *Xho*I y con las combinaciones *Sal*I-*Xho*I y *Xba*I/*Xho*I. El objetivo fue determinar con cuál de estas enzimas se podía obtener una serie de fragmentos que cumplieran dos requisitos: tener la longitud suficiente como para poder ser introducidos en un vector de clonación de las características de pBluescript SK (Stratagene) y sumar en conjunto un tamaño lo más aproximado posible al estimado previamente para pFM82139 (Figuras 3.1 y 3.2).

A la vista de los resultados del análisis electroforético de las muestras, ninguna de las enzimas satisfacía por completo las dos premisas, si bien *Hind*III era la que más se ajustaba a las mismas. Los seis fragmentos *Hind*III de aproximadamente 16, 12.4, 10.3, 3.7, 2.7 y 2 kb que *de visu* se detectaron en el gel de agarosa al 0.7% totalizaban un tamaño en torno a las 47 kb. Esto significaba que faltaban alrededor de 12-13 kb para completar las 60 kb de las que constaba pFM82139.

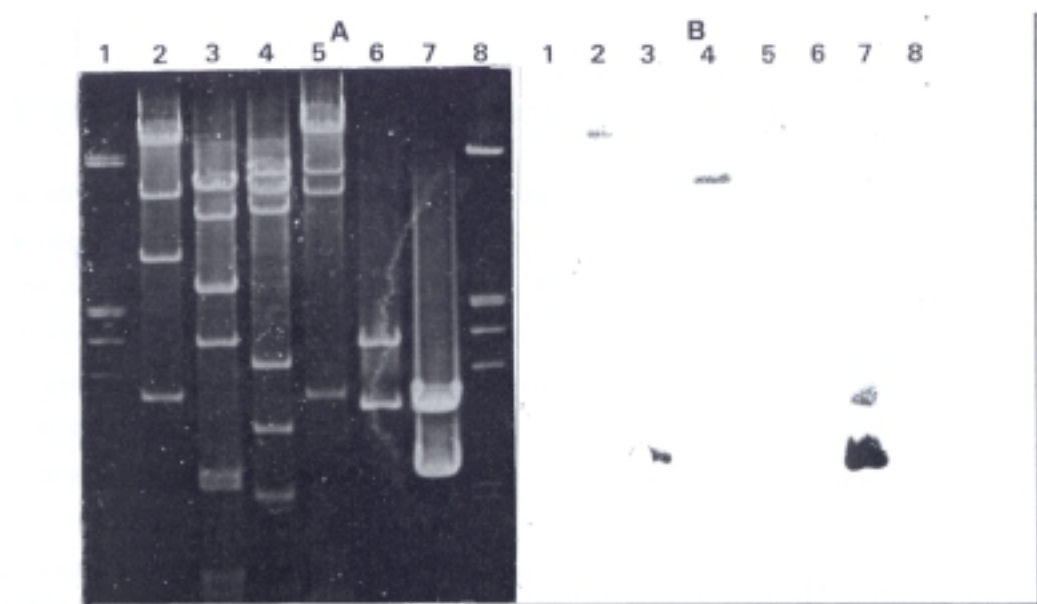
Se barajaron dos hipótesis que podían explicar este hecho. Una era la posible existencia de múltiples y próximos puntos de corte *Hind*III que originaran, tras la digestión del plásmido con dicha enzima, fragmentos de DNA lo suficientemente pequeños como para no poder ser detectados en geles de agarosa y que constituyeran las 12-13 kb que faltaban para completar las 60 kb. La otra, que fue la que pareció más verosímil, planteaba la existencia de dos o más fragmentos *Hind*III de igual tamaño y que por tanto no pudieran ser distinguidas como bandas distintas en geles de agarosa de los porcentajes habituales. Preparando geles de un menor porcentaje de agarosa (0.5%) y aplicando menores voltajes se consiguió el desdoblamiento de la segunda banda *Hind*III, que anteriormente se había considerado como una banda sencilla de



12.4 kb, en dos bandas de un tamaño correspondiente a 12.4 y 12.9 kb con lo cual la suma de los tamaños de todos los fragmentos *Hind*III de pFM82139 ya estaba alrededor de las 60 kb.



**Figura 3.1.-** Análisis electroforético en gel de agarosa del 0.7% de la digestión de pFM82139 con (2) *Xho*I, (4) *Eco*RI, (6) *Hind*III, (8) *Xba*I y (10) *Sal*I-*Xho*I. En los carriles 1, 3, 5, 7 y 9 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales).



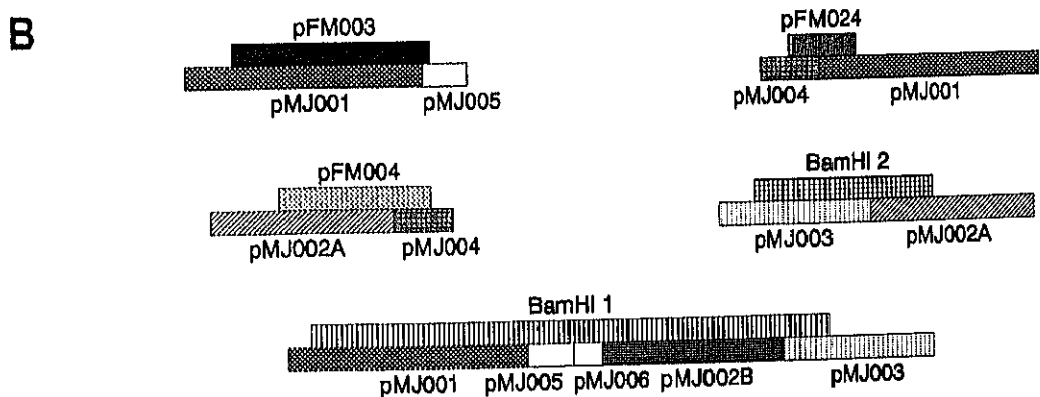
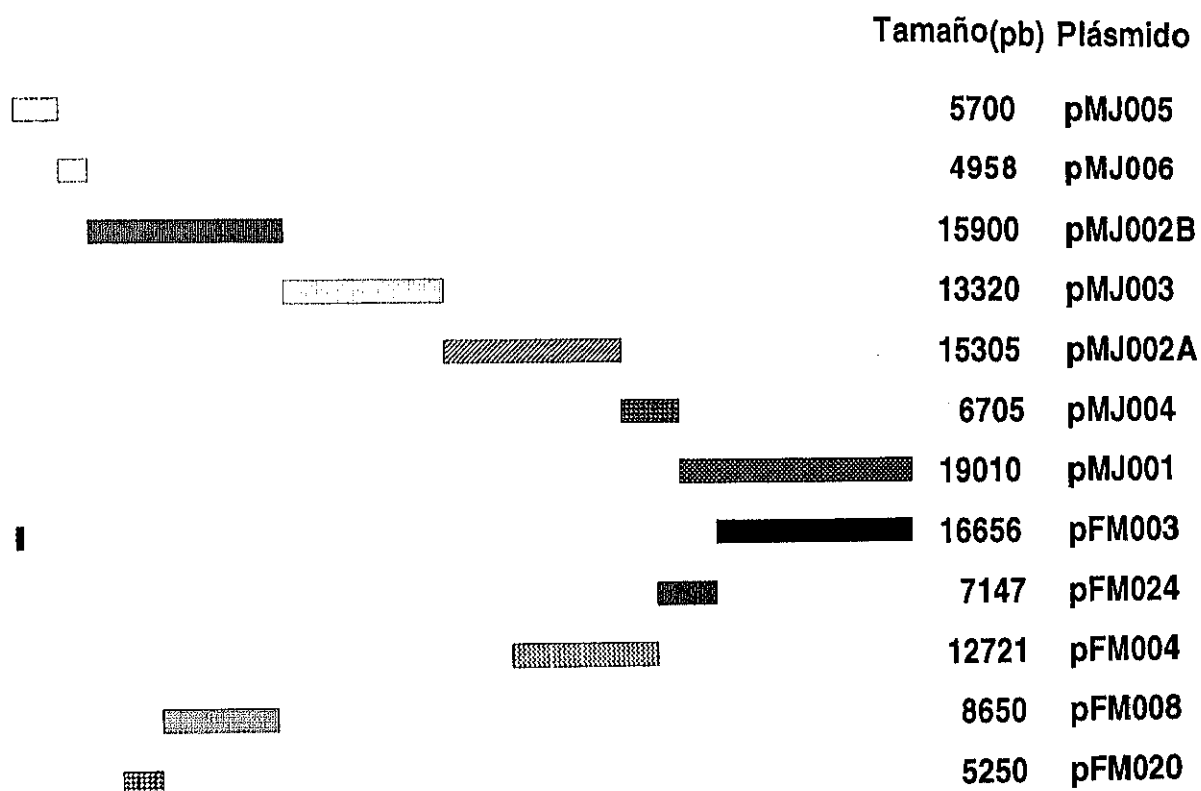
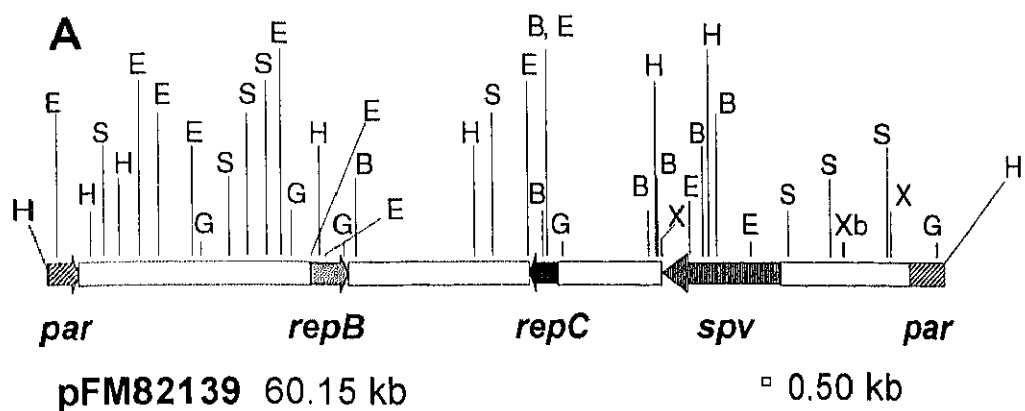
**Figura 3.2.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa del 0.7% de pFM82139 digerido con (2) *Bam*HI, (3) *Eco*RI, (4) *Hind*III y (5) *Xba*I-*Xho*I. En los carriles 6 y 7 digestión con *Eco*RI de pFM024 y pFM020 respectivamente. En los carriles 1 y 8 patrón de pesos moleculares III (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA empleando como sonda el fragmento *Eco*RI de pFM020.

Una vez comprobado que estos siete fragmentos representaban la totalidad del plásmido objeto de estudio y que poseían un tamaño adecuado para su clonación, se procedió a su clonación en pBluescript SK. Para ello se digirió pFM82139 con *Hind*III, se electroeluyó cada una de las siete bandas que aparecieron en el gel de electroforesis y se ligaron a pBluescript SK, previamente incubado con *Hind*III, desfosfatizado y electroeluido. Los productos de la ligación se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$  y los transformantes se seleccionaron en placas de LB-ampicilina. Las construcciones resultantes correspondientes a cada uno de los fragmentos *Hind*III, en orden decreciente de tamaño, fueron denominadas: pMJ001, pMJ002B, pMJ002A, pMJ003, pMJ004, pMJ005 y pMJ006 (Figura 3.3).

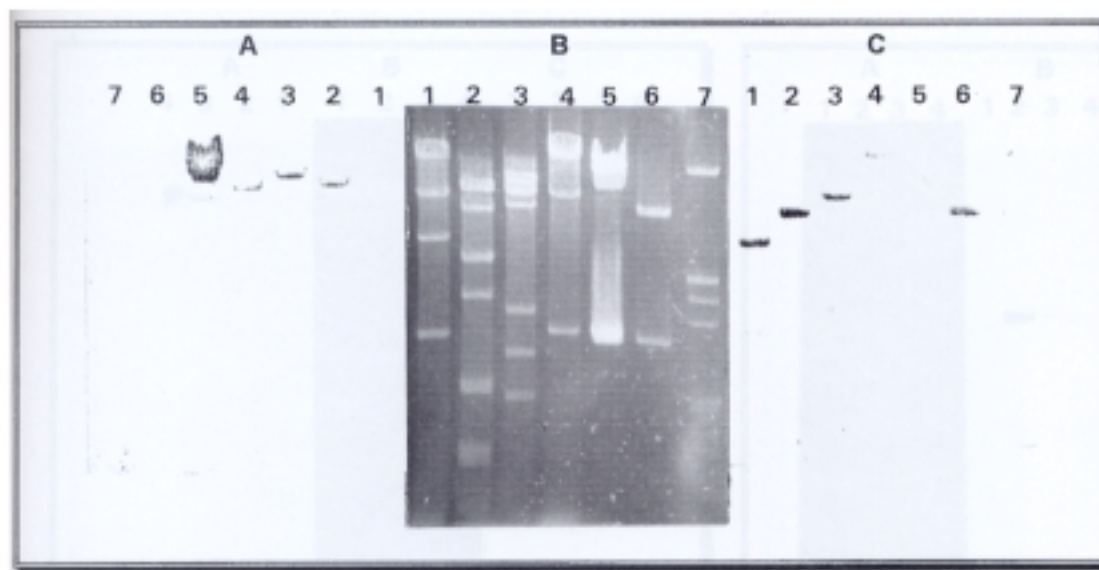
Aunque ya se disponía de una genoteca aparentemente completa del plásmido de *S. enteritidis*, pareció interesante la clonación de algunos de los fragmentos de la digestión de dicho plásmido con *Eco*RI, puesto que de esta forma se dispondría de ellos con una mayor facilidad en posteriores estudios, habida cuenta de las dificultades de extracción de pFM82139. De los nueve fragmentos *Eco*RI que se visualizaron en el gel, cuya suma de tamaños no equivalía al tamaño del plásmido entero quizá por la existencia de bandas dobles, como en el caso de *Hind*III, o de fragmentos muy pequeños, únicamente se clonaron los correspondientes a las cinco bandas mayores. El vector y el procedimiento de clonación utilizados fueron los ya citados anteriormente. Estas nuevas construcciones fueron denominadas (entre paréntesis se especifica el tamaño de los insertos *Eco*RI): pFM003 (13 kb), pFM004 (10 kb), pFM008 (5.5 kb), pFM024 (4.2 kb) y pFM020 (2.3 kb).

### 3.1.3.- Verificación del origen de las construcciones pMJ y pFM.

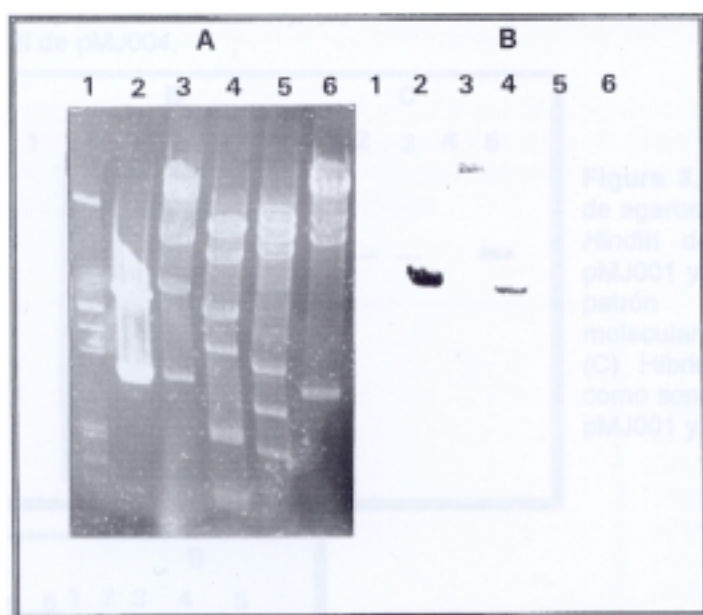
Para comprobar que tanto los fragmentos *Hind*III como *Eco*RI clonados en pBluescript SK tenían un origen plasmídico y no cromosómico o de otra índole, se llevó a cabo un experimento de hibridación no radiactiva mediante la técnica de Southern utilizando como sonda los distintos fragmentos *Hind*III y *Eco*RI obtenidos de cada uno de los clones. Dichas sondas fueron marcadas con digoxigenina y enfrentadas a pFM82139 digerido con las enzimas empleadas en la clonación, así como a los propios clones cortados con las mismas enzimas como control positivo y al DNA del fago lambda cortado con *Hind*III como control negativo. En todos los casos se produjo la hibridación de cada uno de los fragmentos *Hind*III y *Eco*RI obtenidos de las diferentes construcciones, consigo mismo y con la banda de pFM82139 de la que provenían, verificándose de esta manera su origen plasmídico (Figuras 3.2, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 y 3.12)



**Figura 3.3.- A.** Mapa de restricción del plásmido pFM82139 y sus fragmentos clonados en pBluescript SK. Puntos de restricción: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; G, *Bgl*II; H, *Hind*III; S, *Sal*I; X, *Xho*I y Xb, *Xba*I.  
**B.** Esquema de los solapamientos realizados para el cartografiado de pFM82139.



**Figura 3.4.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de DNA plasmídico de pFM82139 digerido con: (1) *Bam*HI, (2) *Eco*RI, (3) *Hind*III y (4) *Xba*I-*Xho*I. En los carriles (5) y (6) DNA plasmídico digerido con *Eco*RI de pFM003 y pFM004 respectivamente. En el carril (7) patrón comercial de pesos moleculares III (ver Materiales). (A) y (C) Hibridaciones del DNA utilizando como sonda los fragmentos *Eco*RI marcados con digoxigenina de los plásmidos pFM003 y pFM004 respectivamente.



**Figura 3.5.-** (A) Análisis electroforético en gel de agarosa al 0,7% de DNA plasmídico de pFM82139 digerido con (3) *Bam*HI, (4) *Eco*RI, (5) *Hind*III y (6) *Xba*I-*Xho*I. En el carril (2) DNA plasmídico de pFM008 digerido con *Eco*RI y en (1) patrón comercial de pesos moleculares III (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA utilizando como sonda el fragmento *Eco*RI marcado con digoxigenina del plásmido pFM008.

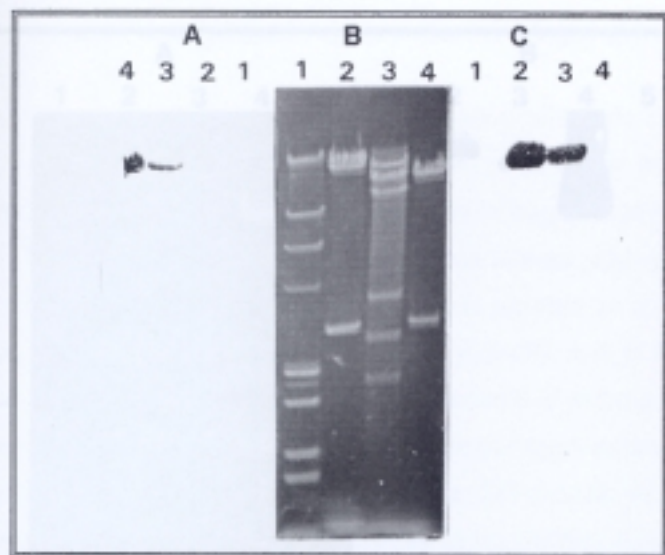


Figura 3.6.

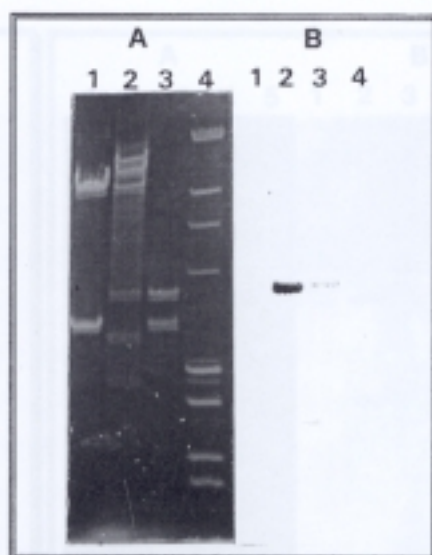
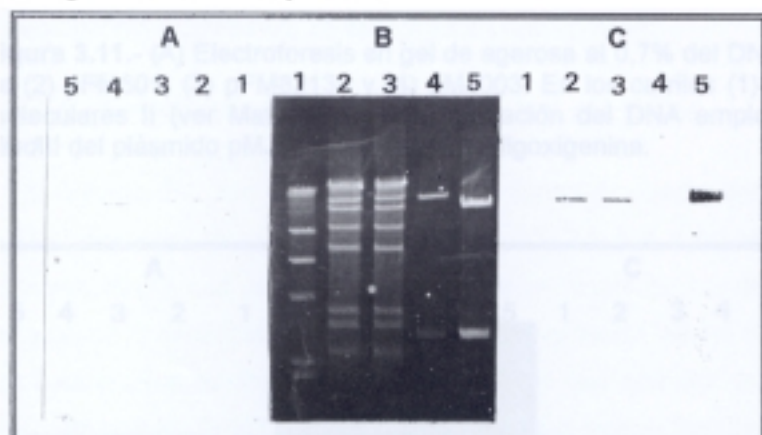


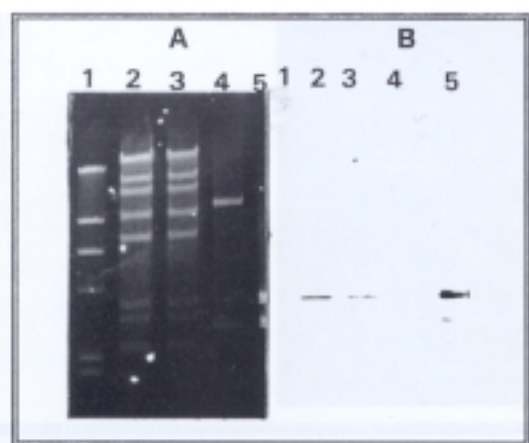
Figura 3.7.

**Figura 3.6.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa del 1% de DNA digerido con *Hind*III de (2) pMJ001, (3) pFM82139 y (4) pMJ002A. En el carril 1 patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales). (A) y (C) Hibridaciones del DNA utilizando como sonda los fragmentos *Hind*III de pMJ002A y pMJ001 respectivamente.

**Figura 3.7.-** (A) Análisis electroforético en gel de agarosa del 1% de DNA digerido con *Hind*III de (1) pMJ003, (2) pFM82139 y (3) pMJ004. En el carril 4 patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA empleando como sonda el fragmento *Hind*III de pMJ004.



**Figura 3.8.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa del 1% de la digestión con *Hind*III de (2) y (3) pFM501, (4) pMJ001 y (5) pMJ002A. En el carril 1 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (A) y (C) Hibridación del DNA utilizando como sonda los fragmentos *Hind*III de pMJ001 y pMJ002A respectivamente.



**Figura 3.9.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa del 1% de la digestión con *Hind*III de (2) y (3) pFM501, (4) pMJ003 y (5) pMJ004. En el carril 1 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA empleando como sonda el fragmento *Hind*III de pMJ004.



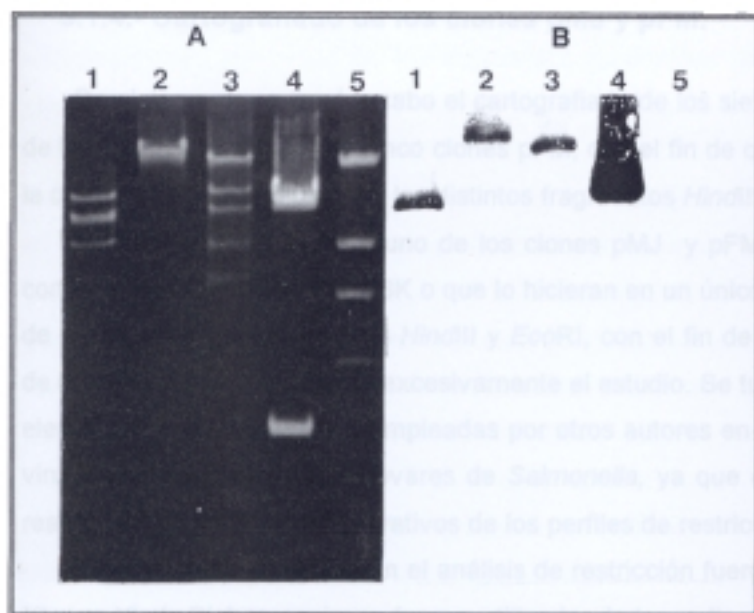


Figura 3.10

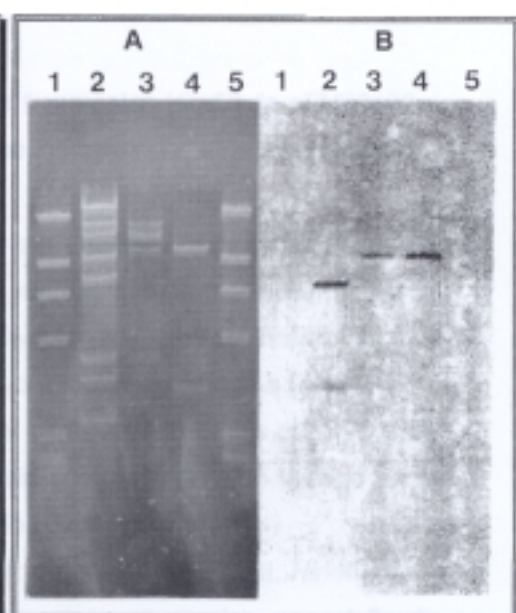
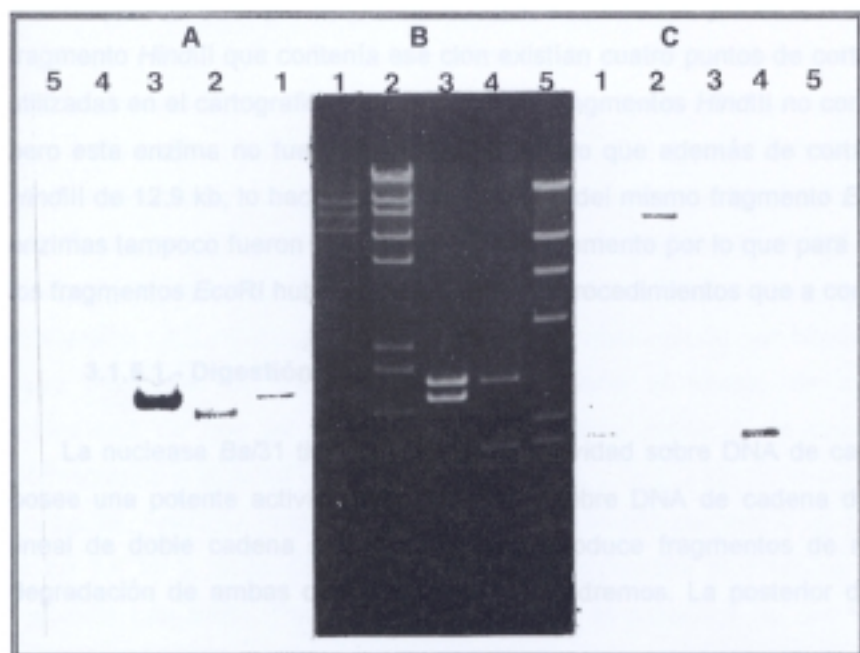


Figura 3.11

**Figura 3.10.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% de DNA plasmídico digerido con *Hind*III de (1) pFM82139, (3) pFM501, (4) pMJ002B. En el carril (2) pFM501 sin tratar y en el carril (5) patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA utilizando como sonda el fragmento *Hind*III del plásmido pMJ002B marcado con digoxigenina.

**Figura 3.11.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% del DNA plasmídico digerido con *Hind*III de (2) pFM501, (3) pFM82139 y (4) pMJ003. En los carriles (1) y (5) patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA empleando como sonda el fragmento *Hind*III del plásmido pMJ003 marcado con digoxigenina.



**Figura 3.12.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% del DNA plasmídico digerido con *Hind*III de (1) pFM82139, (2) pFM501, (3) pMJ005 y (4) pMJ006. En el carril (5) patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (A) y (C) Hibridaciones del DNA utilizando como sonda los fragmentos *Hind*III marcados con digoxigenina de los plásmidos pMJ005 y pMJ006 respectivamente.

### 3.1.4.- Cartografiado de los clones pMJ y pFM.

Paralelamente se llevó a cabo el cartografiado de los siete fragmentos *HindIII* de pFM82139 y de los insertos *EcoRI* de los cinco clones pFM, con el fin de que los datos combinados permitieran la ordenación y orientación de los distintos fragmentos *HindIII*.

Para ello se digirió cada uno de los clones pMJ y pFM con una serie de enzimas que no cortaran el vector pBluescript SK o que lo hicieran en un único punto, y que tampoco fragmentaran de forma excesiva los insertos *HindIII* y *EcoRI*, con el fin de facilitar su localización en cada uno de los mismos y no complicar excesivamente el estudio. Se tuvo también en cuenta a la hora de la elección de las enzimas, las empleadas por otros autores en el cartografiado de los plásmidos de virulencia de los distintos serovares de *Salmonella*, ya que esto podía ser de gran utilidad en la realización de estudios comparativos de los perfiles de restricción de los mismos.

Las enzimas empleadas en el análisis de restricción fueron: *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII*, *Sall*, *XbaI* y *XhoI*. Dichas enzimas fueron utilizadas independientemente y en parejas, con el fin de situar de forma precisa sus puntos de corte en cada uno de los fragmentos. En los casos en que esto no fue posible se recurrió a la combinación de las anteriores enzimas con otras de similares características en cuanto a puntos de corte en el vector de clonación y en los insertos, tales como *SmaI*, *KpnI*, *PstI*, *ClaI*, *BglI*, *EcoRV*, *SacI*, *SalI* y *Apal* (Figura 3.3).

Como el cartografiado del clon pMJ002B fue más complejo, y requirió la utilización de procedimientos adicionales, se describirá en otro apartado.

### 3.1.5.- Cartografiado de la construcción pMJ002B.

El estudio del clon pMJ002B fue más complejo puesto que al someterlo a digestión con *EcoRI* aparecieron cinco bandas de 5.7, 3.4, 2.3, 2.1, 1.3, y 1.2 kb, lo cual indicaba que dentro del fragmento *HindIII* que contenía ese clon existían cuatro puntos de corte para *EcoRI*. Las enzimas utilizadas en el cartografiado del resto de los fragmentos *HindIII* no cortaban, a excepción de *Sall*, pero esta enzima no fue de gran ayuda puesto que además de cortar en tres puntos el inserto *HindIII* de 12.9 kb, lo hacía únicamente dentro del mismo fragmento *EcoRI* de 5.7 kb. Las demás enzimas tampoco fueron útiles en un primer momento por lo que para empezar a situar alguno de los fragmentos *EcoRI* hubo de recurrir a otros procedimientos que a continuación se detallan.

#### 3.1.5.1.- Digestión con *Bal31*.

La nucleasa *Bal31* tiene una elevada actividad sobre DNA de cadena sencilla pero también posee una potente actividad exonucleásica sobre DNA de cadena doble. La digestión de DNA lineal de doble cadena con esta nucleasa produce fragmentos de menor tamaño debido a la degradación de ambas cadenas en los dos extremos. La posterior digestión de los fragmentos

producidos con una endonucleasa de restricción y su análisis electroforético permite el rápido establecimiento del orden de los fragmentos producidos por dicha endonucleasa de restricción puesto que la migración de los mismos ya no será igual a la de los fragmentos no sujetos a la acción exonucleásica.

En primer lugar se linearizó el clon pMJ002B con una enzima que tuviera un punto único de corte en un lugar conocido, concretamente en el *polylinker* del vector de clonación, para que *Ba*/31 pudiera actuar. Se eligió *Bam*HI. Tras linearizar el clon, se digirió durante 45 minutos con *Ba*/31, puesto que se comprobó que era el tiempo de incubación más conveniente. Después se sometió a restricción con *Eco*RI para ver cuáles eran las bandas que disminuían de tamaño con respecto al patrón obtenido al cortar pMJ002B con dicha enzima. Se observó que la única banda que disminuía de tamaño era de 1.3 kb lo cual indicaba que estaba en un extremo del fragmento *Hind*III de pMJ002B y que era contigua a la banda de 3.4 kb que contenía al vector de clonación y por tanto al punto de corte de *Xba*I (Figura 3.13).

La realización de un experimento de hibridación utilizando como sondas los fragmentos *Eco*RI de 1.3 kb frente a una restricción con *Eco*RI del plásmido pFM82139, sirvió para confirmar este resultado. En dicha hibridación se observó como la sonda de 1.3 kb hibridaba con un fragmento *Eco*RI de mayor tamaño, lo cual significaba que no constituía un fragmento *Eco*RI por sí sólo sino que formaba parte de uno mayor, por lo que debía localizarse en un extremo de la banda *Hind*III de pMJ002B. Por otro lado la banda de 1.2 kb hibridó con una banda *Eco*RI de pFM82139 de su mismo tamaño lo que indicaba que se trataba de una banda de localización interna dentro del fragmento *Hind*III de pMJ002B (Figura 3.15).

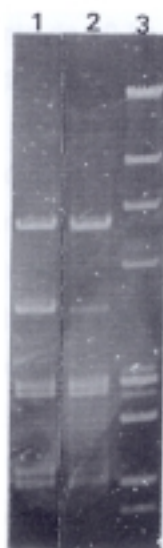
### 3.1.5.2.- Restricciones parciales.

La incubación del DNA con una endonucleasa de restricción durante breves, pero progresivamente mayores, períodos de tiempo permite obtener una serie de patrones de restricción parcial cuyo estudio permite predecir el orden en el que están situados los fragmentos a que dicha endonucleasa de restricción da lugar. El mismo efecto se puede obtener empleando diluciones sucesivas de la enzima con un mismo periodo de incubación.

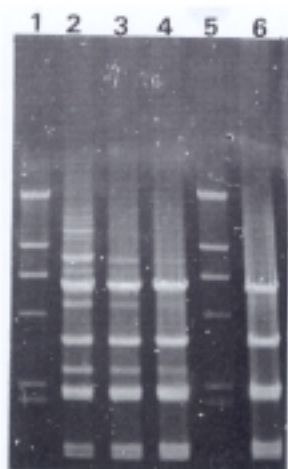
Para situar los puntos de corte de *Eco*RI del fragmento *Hind*III de pMJ002B se recurrió a Incubar este clon con dicha endonucleasa durante distintos tiempos, 10, 20 y 30 minutos, y al analizarlas electroforéticamente se observó la existencia de una banda de aproximadamente 8 kb cuya intensidad disminuía conforme aumentaba el tiempo de incubación. Esto era señal inequívoca de que se trataba de un fragmento producto de una restricción parcial, y que correspondía a la suma de las bandas de 5.7 kb y de 2.3 kb, de lo cual se podía deducir que eran contiguas. Aparecía también una banda de un tamaño cercano a las 5 kb, atribuible a la suma de la de 3.4 kb y de la de 1.3 kb, dato que corroboraba el obtenido en el experimento anterior realizado con *Ba*/31. Por último, se observaba la presencia de una banda de 2.5 kb que podía



corresponder a la suma de las bandas de 1.3 kb y 1.2 kb, lo cual sirvió para deducir cuál era la banda *EcoRI* que iba a continuación de la de 1.3 kb (Figura 3.14).



**Figura 3.13.-** Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% de pMJ002B, (1) digerido con *EcoRI*, (2) linearizado con *BamHI*, tratado con *Bal31* y digerido con *EcoRI* y (3) patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales)



**Figura 3.14.-** → Análisis electroforético en gel de agarosa al 0,7% del DNA de pMJ002B digerido parcialmente con *EcoRI* mediante incubación a distintos tiempos: (2) 10 minutos, (3) 20 minutos y (4) 30 minutos. En el carril (6) digestión total de pMJ002B con *EcoRI* y en los carriles (1) y (5) patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales).

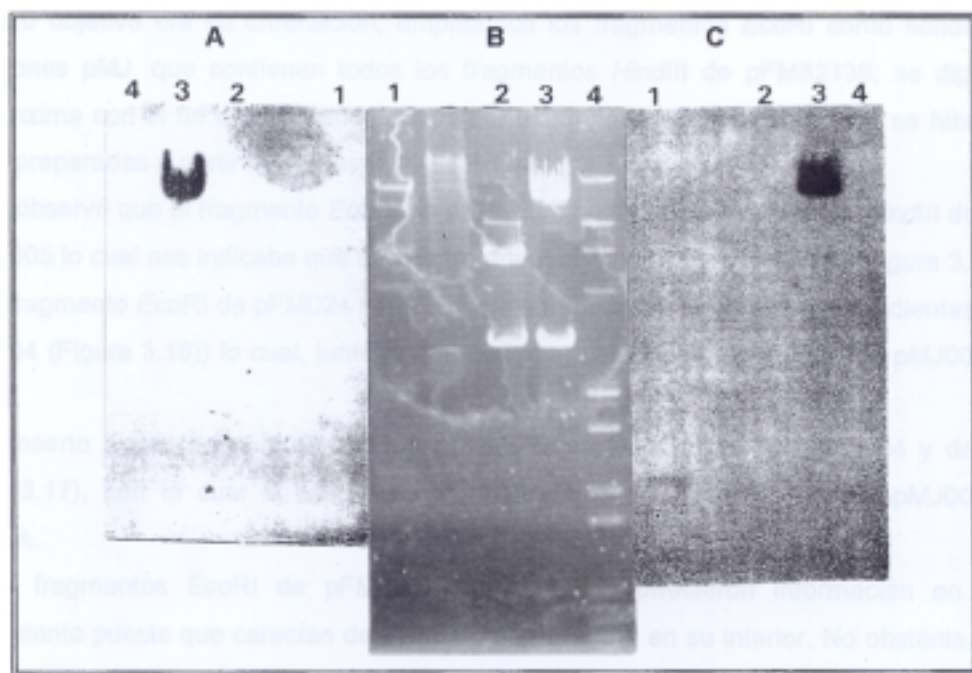
### 3.1.5.3.- Análisis de restricción.

Para terminar de situar todos los fragmentos *EcoRI* de pMJ002B y para confirmar la ordenación de los ya situados por los anteriores procedimientos, se recurrió al estudio detallado de su patrón de restricción. En este análisis fue de gran utilidad la enzima de restricción *BglII*. Esta tenía dos puntos de corte, perfectamente situados en el mapa de pMJ002B, que daban lugar a un fragmento de 10 kb y a otro de 5.9 kb. Dichos fragmentos se electroeluyeron y se digirieron por separado con *EcoRI*.

Se vió que el fragmento *BglII* de 5.9 kb daba lugar a una banda de 600 pb y a otra de 5.3 kb. Esto indicaba que la banda *EcoRI* de 5.7 kb debía estar incluida casi en su totalidad en este fragmento *BglII*. Por otro lado, la digestión de la banda *BglII* de 10 kb señaló que dentro de ella estaban incluidas por completo las bandas *EcoRI* de 3.4 kb, 1.3 kb, 1.2 kb y 2.3 kb, lo que hacía a esta última contigua a la de 1.2 kb. A la vista de estos resultados, la única banda *EcoRI* que quedaba por situar, la de 2.1 kb, sólo podía estar colocada entre la de 3.4 kb y la de 5.7 kb.

De esta forma la secuencia de fragmentos *EcoRI* de pMJ002B quedó totalmente resuelta.

La disposición de los tres puntos de corte *SaII* fue mucho más sencilla gracias a la existencia de un punto *BglII* situado entre las dianas de *SaII*, que sirvió como referencia para la localización de los mismos.



**Figura 3.15.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, (1) pFM82139 digerido con *EcoRI*, (2) pFM008 digerido con *EcoRI*, (3) pMJ002B digerido con *HindIII* y (4) patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales). (A) y (C) Hibridaciones del DNA empleando como sonda los fragmentos *EcoRI* de 1,3 y 1,2 kb de pMJ002B respectivamente

### 3.1.6.- Localización de los fragmentos *Hind*III en pFM82139.

El siguiente objetivo fue el ordenamiento de los distintos fragmentos *Hind*III ya cartografiados de la misma forma en que se hallaban en pFM82139. Para ello se recurrió a dos procedimientos que se utilizaron de forma simultánea y que fueron :

Estudio comparativo de mapas de restricción

Hibridaciones solapantes

- Por un lado se estudiaron los mapas de restricción de los clones pMJ y pFM (Figura 3.3)) comparando las distancias entre los puntos de corte de las distintas endonucleasas de restricción en las dos clases de clones.

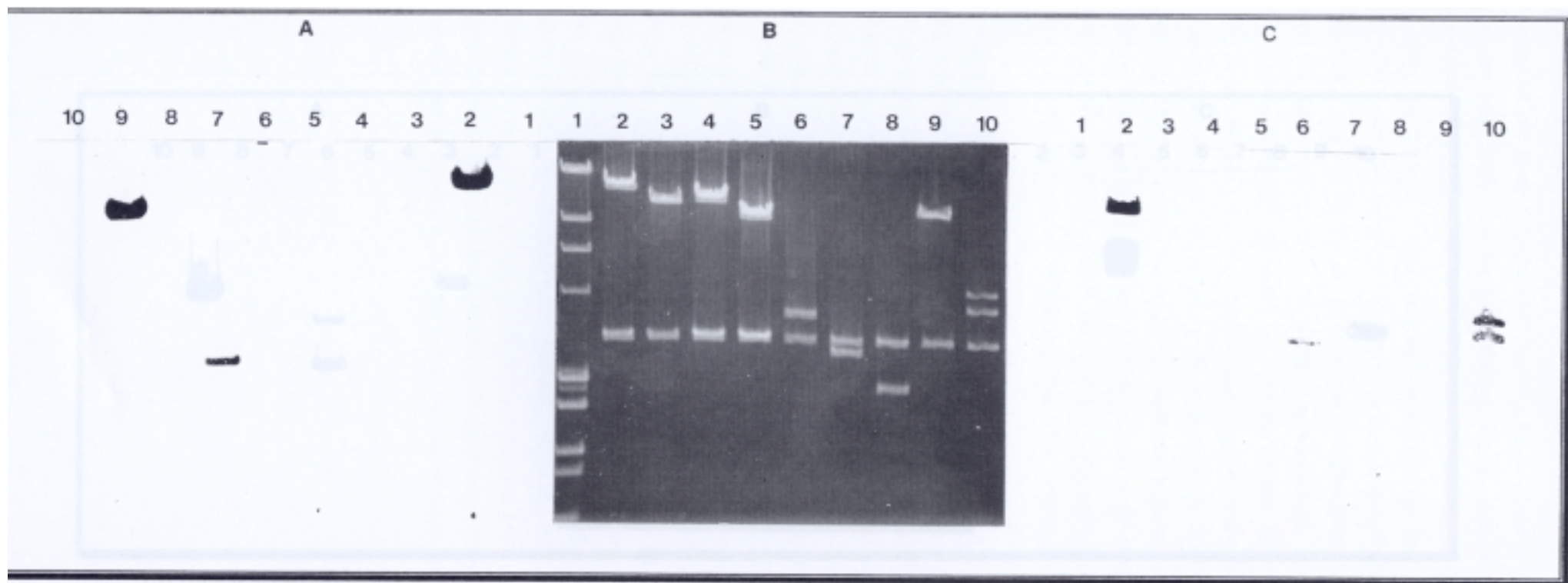
- Por otro lado se realizaron una serie de hibridaciones solapantes entre los fragmentos *Hind*III y los fragmentos *Eco*RI de los dos tipos de clones obtenidos (Figura 3.3). El principio de este procedimiento era muy sencillo: cada fragmento *Eco*RI que tuviera un punto de corte *Hind*III en su interior hibridaría con dos fragmentos *Hind*III, lo que indicaría que dichos fragmentos *Hind*III eran contiguos. Lo mismo ocurriría con los fragmentos *Hind*III que tuvieran un punto de corte *Eco*RI en su interior. Puesto que disponíamos de todos los fragmentos *Hind*III que representaban pFM82139 y nuestro objetivo era su ordenación, empleamos los fragmentos *Eco*RI como sondas. Así, los siete clones pMJ, que contienen todos los fragmentos *Hind*III de pFM82139, se digirieron con dicha enzima con el fin de separarlos del vector de clonación pBluescript SK y se hibridaron con sondas preparadas a partir de los insertos *Eco*RI de los clones pFM.

Se observó que el fragmento *Eco*RI de pFM003 hibridaba con los insertos *Hind*III de pMJ001 y de pMJ005 lo cual nos indicaba que ambos fragmentos *Hind*III eran contiguos (Figura 3.16))

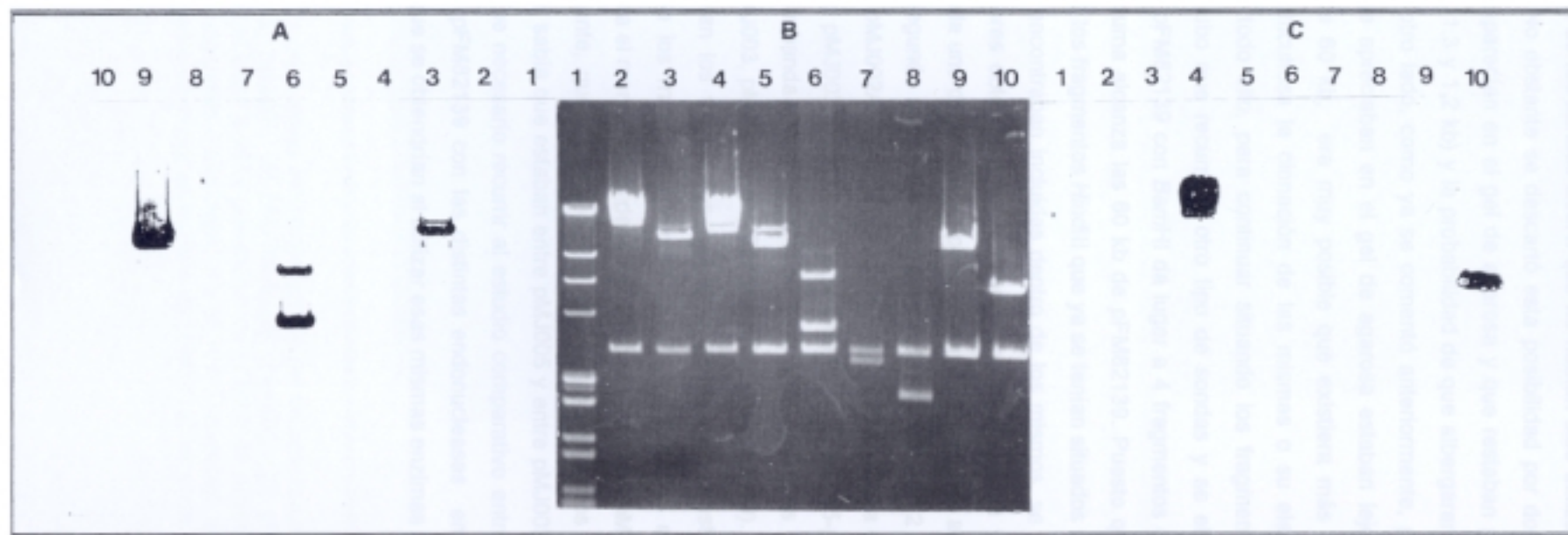
El fragmento *Eco*RI de pFM024 hibridó con los fragmentos *Hind*III correspondientes a pMJ001 y pMJ004 (Figura 3.16)) lo cual, junto al dato anterior, señalaba una ordenación pMJ005-pMJ001-pMJ004.

El inserto *Eco*RI de pFM004 hibridó con los fragmentos *Hind*III de pMJ004 y de pMJ002A (Figura 3.17), con lo cual la secuencia de fragmentos *Hind*III era pMJ005-pMJ001-pMJ004-pMJ002A.

Los fragmentos *Eco*RI de pFM008 y pFM020 no ofrecieron información en cuanto al ordenamiento puesto que carecían de punto de corte *Hind*III en su interior. No obstante, se realizó su hibridación frente a los clones pMJ con el objeto de localizarlos. Se observó que ambos hibridaron con el inserto *Hind*III del clon pMJ002B (Figura 3.17).



**Figura 3.16.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% de DNA plasmídico digerido con *Hind*III de (2) pMJ001, (3) pMJ002A, (4) pMJ002B, (5) pMJ003, (6) pMJ004, (7) pMJ005 y (8) pMJ006. En los carriles 9 y 10 DNA plasmídico digerido con *Eco*RI de los plásmidos pFM003 y pFM024 respectivamente. En el carril 1 patrón comercial de pesos moleculares número II y VI (ver Materiales ). (A) y (C) Hibridaciones del DNA empleando como sonda los fragmentos *Eco*RI marcados con digoxigenina de pFM003 y pFM024 respectivamente.

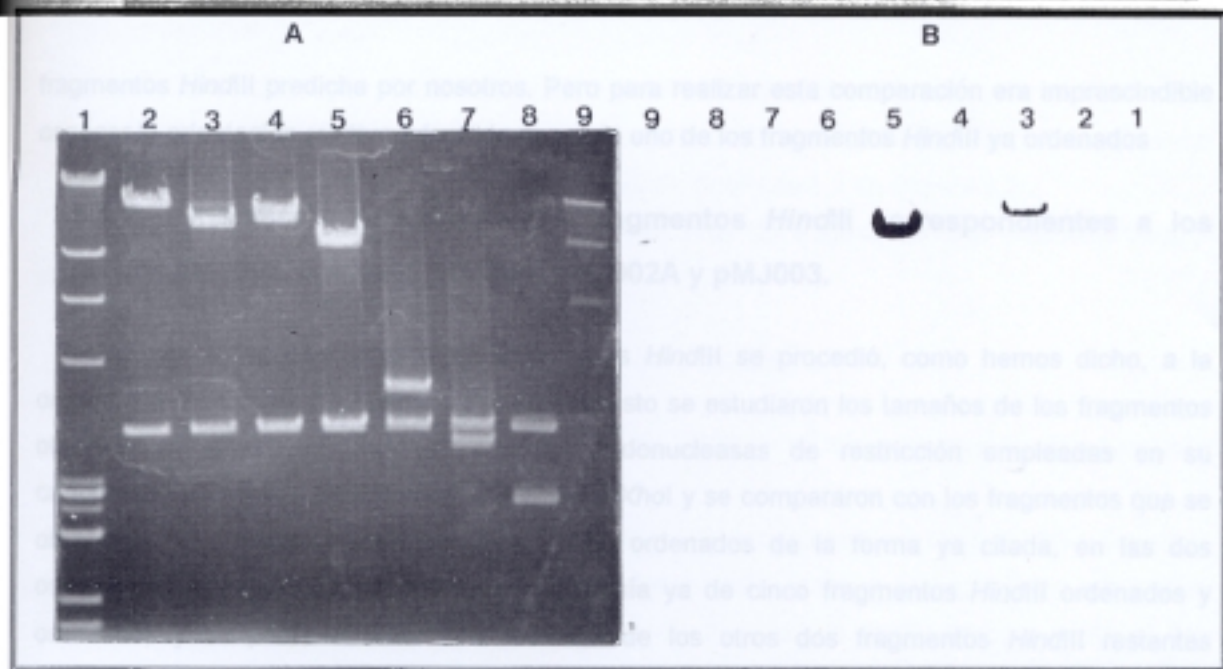


**Figura 3.17.-** (B) Electroforesis de DNA plasmídico en gel de agarosa al 0,7% de DNA plasmídico digerido con *Hind*III de (2) pMJ001, (3) pMJ002A, (4) pMJ002B, (5) pMJ003, (6) pMJ004, (7) pMJ005 y (8) pMJ006. En los carriles (9) y (10) DNA digerido con *Eco*RI de los plásmidos pFM004 y pFM008 respectivamente. En el carril (1) patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales). (A) y (C) Hibridaciones de DNA empleando como sonda los fragmentos *Eco*RI marcados con digoxigenina de los plásmidos pFM004 y pFM008 respectivamente.

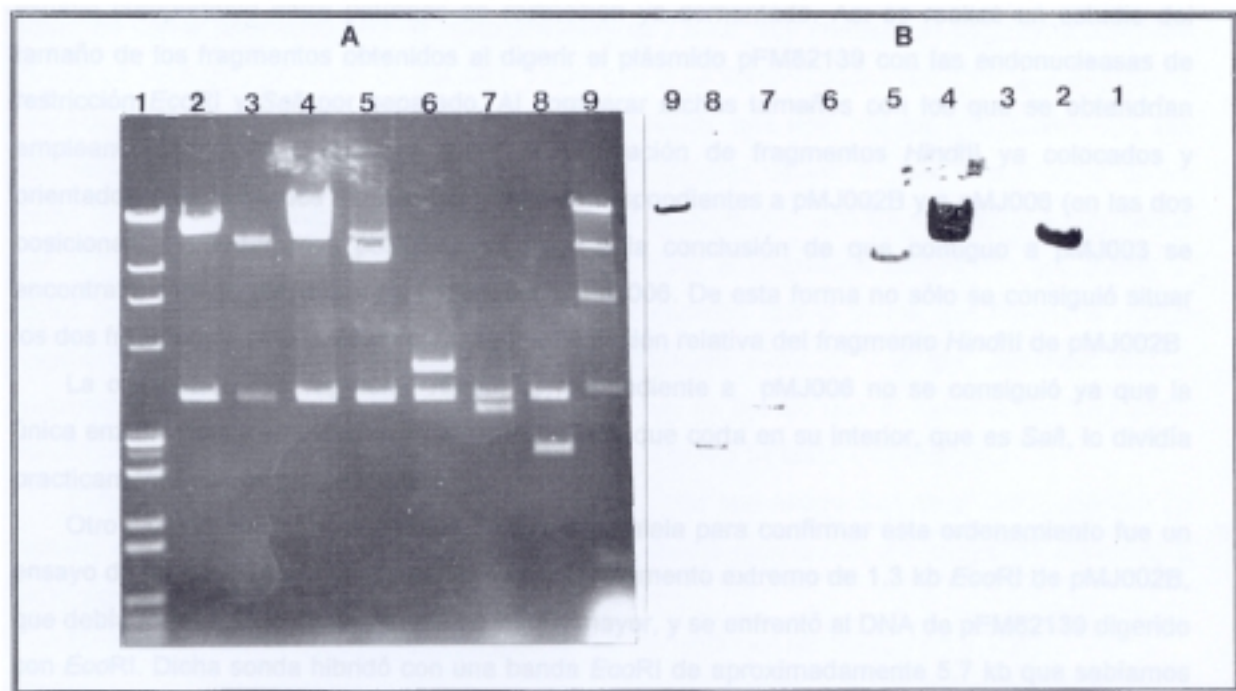


Restaban por situar 3 fragmentos *Hind*III y no se disponía ya de más clones pFM de donde obtener sondas *Eco*RI. La única posibilidad era la digestión de pFM82139 con *Eco*RI, la electroelución de las bandas *Eco*RI que no habían sido utilizadas aún como sondas y su empleo como tales. No obstante se descartó esta posibilidad por dos razones. Por un lado las bandas *Eco*RI que aparecían en el gel de agarosa y que restaban por emplear eran de muy pequeño tamaño (2.1, 1.3 y 1.2 kb) y la probabilidad de que albergaran un punto *Hind*III en su interior era escasa. Por otro lado, como ya se comentó anteriormente, puesto que la suma de las bandas *Eco*RI que se apreciaban en el gel de agarosa estaban lejos de alcanzar el tamaño total de pFM82139 de 60 kb, era muy posible que existiera más de un banda doble lo cual hacía demasiado dificultosa la clonación de las mismas o su electroelución para emplearlas como sondas. Por todo ello, para continuar situando los fragmentos *Hind*III mediante hibridaciones solapantes hubo que recurrir a otro tipo de sondas y se eligieron los fragmentos *Bam*HI. La digestión de pFM82139 con *Bam*HI da lugar a 4 fragmentos de tamaño bastante grande (Figura 3.2) y cuya suma alcanza las 60 kb de pFM82139. Puesto que por el estudio de los mapas de restricción de los fragmentos *Hind*III que ya se tenían situados se sabía que las dos bandas *Bam*HI menores se encontraban incluidas dentro de los mismos, se electroeluyeron únicamente las dos bandas mayores obtenidas. Se marcaron con digoxigenina y se enfrentaron a los fragmentos *Hind*III de cada uno de los clones pMJ. Dichas hibridaciones arrojaron nueva información. En una de ellas la segunda banda *Bam*HI, de aproximadamente 12 kb, hibridó con las bandas *Hind*III clonadas en pMJ002A y pMJ003 (Figura 3.18). Esto indicaba que el fragmento *Hind*III contiguo a pMJ002A era pMJ003, dando lugar a la ordenación: pMJ005-pMJ001-pMJ004-pMJ002A-pMJ003. En la otra, la banda mayor *Bam*HI de pFM82139, de unas 35 Kb, hibridó con los fragmentos *Hind*III de pMJ003, pMJ002B, pMJ006 y pMJ005 (Figura 3.19). De esta forma se cerraba el círculo que constituían los fragmentos *Hind*III en pFM82139 puesto que esta banda grande *Bam*HI hibridaba con los fragmentos *Hind*III que se encontraban en los extremos de la ordenación obtenida hasta el momento, es decir los correspondientes a pMJ005 y a pMJ003.

No obstante, quedaban aún por situar los fragmentos *Hind*III incluidos en pMJ006 y en pMJ002B. Se sabía que estaban entre pMJ005 y entre pMJ003, pero no su posición relativa. Para localizarlos fue necesario recurrir al estudio comparativo entre los fragmentos producidos por la digestión de pFM82139 con las distintas endonucleasas empleadas en el cartografiado y los fragmentos que se obtendrían al utilizar esas mismas enzimas sobre la ordenación de los distintos



**Figura 3.18.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa del 0.7% del DNA digerido con *Hind*III de (2) pMJ001, (3) pMJ002A, (4) pMJ002B, (5) pMJ003, (6) pMJ004, (7) pMJ005 y (8) pMJ006. En el carril (9) pFM82139 digerido con *Bam*HI y en el carril (1) patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA utilizando como sonda el segundo fragmento mayor en tamaño de pFM82139 digerido con *Bam*HI.



**Figura 3.19.-** (A) Análisis electroforético en gel de agarosa al 0,7% de DNA plasmídico digerido con *Hind*III de (2) pMJ001, (3) pMJ002A, (4) pMJ002B, (5) pMJ003, (6) pMJ004, (7) pMJ005 y (8) pMJ006. En el carril 9 DNA plasmídico de pFM82139 digerido con *Bam*HI y en el carril 1 patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales). (B) Hibridación de DNA utilizando como sonda el fragmento mayor en tamaño de pFM82139 digerido con *Bam*HI.

fragmentos *HindIII* predicha por nosotros. Pero para realizar esta comparación era imprescindible conocer la orientación relativa adoptada por cada uno de los fragmentos *HindIII* ya ordenados

### 3.1.7.- Orientación relativa de los fragmentos *HindIII* correspondientes a los clones pMJ005, pMJ001, pMJ004, pMJ002A y pMJ003.

Una vez ordenados estos cinco fragmentos *HindIII* se procedió, como hemos dicho, a la orientación relativa de los mismos. Para lograr esto se estudiaron los tamaños de los fragmentos obtenidos al digerir el plásmido con las endonucleasas de restricción empleadas en su cartografiado: *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *Sall*, *XbaI* y *XhoI* y se compararon con los fragmentos que se obtendrían al digerir los distintos clones pMJ, ordenados de la forma ya citada, en las dos orientaciones posibles. De esta forma se disponía ya de cinco fragmentos *HindIII* ordenados y orientados y se podía afrontar la colocación de los otros dos fragmentos *HindIII* restantes correspondientes a pMJ006 y a pMJ002B.

### 3.1.8.- Ordenación de pMJ006 y pMJ002B.

Para situarlos se emplearon dos procedimientos. Por un lado se procedió a efectuar el estudio comparativo entre patrones de restricción ya comentado. Así se realizó un estudio del tamaño de los fragmentos obtenidos al digerir el plásmido pFM82139 con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *Sall* por separado. Al comparar dichos tamaños con los que se obtendrían empleando las mismas enzimas sobre la ordenación de fragmentos *HindIII* ya colocados y orientados y sobre los dos fragmentos *HindIII* correspondientes a pMJ002B y a pMJ006 (en las dos posiciones y orientaciones posibles), se llegó a la conclusión de que contiguo a pMJ003 se encontraba situado pMJ002B y a continuación pMJ006. De esta forma no sólo se consiguió situar los dos fragmentos sino también conocer la orientación relativa del fragmento *HindIII* de pMJ002B.

La orientación del fragmento *HindIII* correspondiente a pMJ006 no se consiguió ya que la única enzima de las empleadas en el cartografiado que corta en su interior, que es *Sall*, lo dividía prácticamente en dos partes iguales.

Otro experimento que se efectuó de forma paralela para confirmar este ordenamiento fue un ensayo de hibridación. Se utilizó como sonda el fragmento extremo de 1.3 kb *EcoRI* de pMJ002B, que debía formar parte de un fragmento *EcoRI* mayor, y se enfrentó al DNA de pFM82139 digerido con *EcoRI*. Dicha sonda hibridó con una banda *EcoRI* de aproximadamente 5.7 kb que sabíamos que era doble (Figura 3.15). Uno de los fragmentos *EcoRI* que formaba parte de esa doble banda constituía el clon pFM008, que por hibridación y análisis por restricción sabíamos que estaba situada dentro del clon pMJ002B. Dicha banda de 1.3 kb no hibridó, como era lógico esperar, con la banda *EcoRI* de 5.7 kb correspondiente a pFM008. La hibridación del fragmento *EcoRI* de 1.3 kb con la banda *EcoRI* de 5.7 kb solamente se podía explicar, teniendo en cuenta los fragmentos



*EcoRI* a los que daba lugar pFM82139, si entre pMJ002B y pMJ005 se encontraba pMJ006. Otro experimento de hibridación que confirmó este resultado fue que el fragmento *HindIII* de 2 kb correspondiente a pMJ006 hibridó con la misma banda *EcoRI* de 5.7 kb (Figura 3.20).

De esta forma se estableció que la secuencia final de fragmentos era: pMJ005-pMJ001-pMJ004-pMJ002A-pMJ003-pMJ002B-pMJ006.

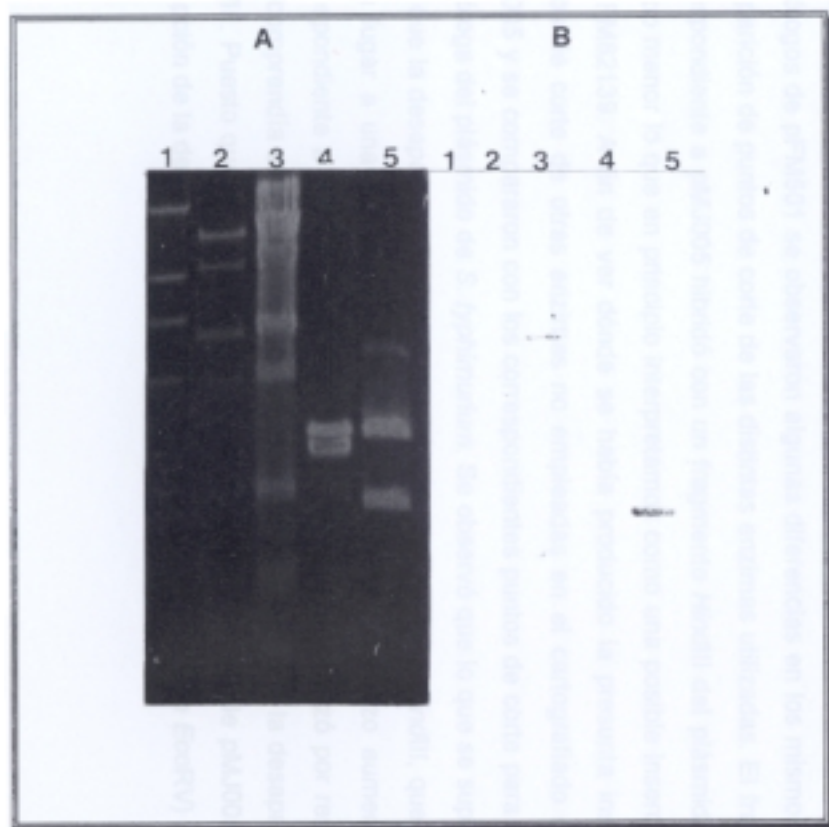
### 3.1.9.- Orientación del fragmento *HindIII* de pMJ006.

La orientación del fragmento *HindIII* del clon pMJ002B ya se había conseguido anteriormente a la vez que se había logrado su colocación.

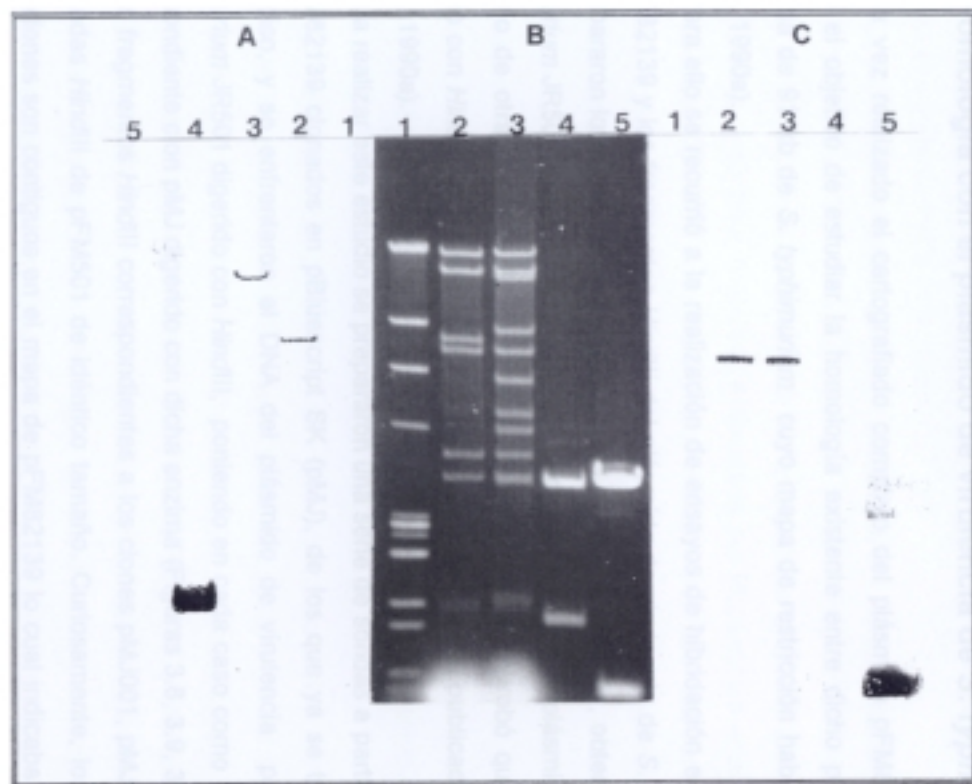
La orientación del fragmento de 2 kb *HindIII* correspondiente al clon pMJ006 fue más problemática puesto que, como ya se comentó anteriormente, la única enzima de las empleadas en el cartografiado que tenía punto de corte en su interior, *SaI*, lo dividía prácticamente en dos partes iguales. Esto hacía imposible su orientación basándonos únicamente en la comparación de los tamaños de los siete fragmentos *SaI* de pFM82139 con los fragmentos *SaI* que obtendríamos tras la ordenación de los restantes clones pMJ. Es por ello que hubo que recurrir a la realización de un ensayo de hibridación utilizando como sondas dos fragmentos de dicho inserto obtenidos a cada lado del punto *SaI* y después de enfrentarlas a pFM82139 digerido con *SaI* ver cuál de ellas hibridaba con el fragmento *SaI* de aproximadamente 7.5 kb, que contenía el fragmento completo *HindIII* de pMJ005 y parte del de pMJ001, y cuál con el de aproximadamente 8 kb, que englobaba prácticamente la mitad del fragmento *HindIII* de pMJ002B, que eran los dos fragmentos *SaI* que compartía pMJ006. Fue de gran utilidad para poder obtener dichas sondas la existencia de un punto de corte *ClaI* dentro del fragmento *HindIII* de pMJ006. Así, una de ellas estaba constituida por el fragmento *SaI-ClaI* y medía 550 pb y la otra por el fragmento *SaI-HindIII* que cubría la mitad del inserto, de aproximadamente 1 kb. Se comprobó que la sonda que hibridaba con el fragmento de 7.5 kb era la constituida por el fragmento *SaI-ClaI* y la que hibridaba con el fragmento de 8 kb era la sonda *SaI-HindIII* de lo que se dedujo que el extremo del fragmento *HindIII* de 2 kb contiguo a pMJ005 era el que poseía el punto de corte *ClaI* (Figura 3.21).

El hecho de que el fragmento *SaI-ClaI* hibridara con una banda *SaI* de pFM501 idéntica en tamaño a la de pFM82139 y que el fragmento *SaI-XbaI* lo hiciera con una mayor se interpretará en el siguiente apartado.

El mapa de restricción definitivo de pFM82139 se detalla en las figuras 3.3 y 3.22.



**Figura 3.20.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% de DNA (2) y (3) pFM82139 digerido con *EcoRI*, (4) pMJ005 digerido con *HindIII* y (5) pMJ006 digerido con *HindIII*. En el carril (1) patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA utilizando como sonda el fragmento *HindIII* de pMJ 006.



**Figura 3.21.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (2) pFM82139 digerido con *Sall*, (3) pFM501 digerido con *Sall*, (4) pSLH006 digerido con *Sall-HindIII*, (5) pSLC006 digerido con *Sall-ClaI* y (1) patrones de pesos moleculares II y VI (ver Materiales). (A) y (C) Hibridaciones de DNA utilizando como sonda los fragmentos *Sall-HindIII* de pSLH006 y *Sall-ClaI* de pSLC006 respectivamente.

### 3.2.- Homología con el plásmido de virulencia de *S. typhimurium*.

Una vez realizado el cartografiado completo del plásmido pFM82139 de *S. enteritidis* se planteó el objetivo de estudiar la homología existente entre dicho plásmido y el plásmido de virulencia de 91 kb de *S. typhimurium* cuyo mapa de restricción había sido publicado (Tinge y Curtiss, 1990a).

Para ello se recurrió a la realización de ensayos de hibridación entre los fragmentos *Hind*III de pFM82139 y los fragmentos *Hind*III del plásmido de virulencia de *S. typhimurium*. Previamente se compararon los tamaños de los fragmentos *Hind*III de pFM501, obtenido de nuestra cepa de *S. typhimurium* JR501, con los publicados por otros autores para el plásmido de virulencia pStSR100 originario de otra cepa de *S. typhimurium* JR501. Se comprobó que el patrón de restricción obtenido con *Hind*III en nuestro plásmido era indistinguible del publicado para pStSR100 (Tinge y Curtiss, 1990a).

Para realizar este estudio se prepararon una serie de sondas a partir de los fragmentos *Hind*III de pFM82139 clonados en pBluescript SK (pMJ), de los que ya se tenía certeza de su origen plasmídico, y se enfrentaron al DNA del plásmido de virulencia pFM501 de la cepa de *S. typhimurium* JR501 digerido con *Hind*III, poniendo en cada caso como control positivo el DNA del correspondiente clon pMJ digerido con dicha enzima (Figuras 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 y 3.12).

Los fragmentos *Hind*III correspondientes a los clones pMJ001, pMJ002A y pMJ004 hibridaron con bandas *Hind*III de pFM501 de idéntico tamaño. Curiosamente, los insertos *Hind*III de estos cuatro clones son contiguos en el mapa de pFM82139 lo cual indicaba una gran conservación de la secuencia en esta zona de los plásmidos de ambos serovares. No obstante, comparando los mapas de restricción de estos fragmentos *Hind*III de pFM82139 con los de los fragmentos homólogos de pFM501 se observaron algunas diferencias en los mismos en cuanto a aparición y desaparición de puntos de corte de las distintas enzimas utilizadas. El fragmento *Hind*III de 2.7 kb correspondiente a pMJ005 hibridó con un fragmento *Hind*III del plásmido de 91kb de un tamaño 200 pb menor lo que en principio interpretamos como una posible inserción de DNA en esa zona de pFM82139. A fin de ver dónde se había producido la presunta inserción se estudiaron los puntos de corte de otras enzimas no empleadas en el cartografiado del fragmento *Hind*III de pMJ005 y se compararon con los correspondientes puntos de corte para esas enzimas en la zona homóloga del plásmido de *S. typhimurium*. Se observó que lo que se suponía una inserción no era más que la desaparición en pFM82139 de un punto de corte *Hind*III, que en el plásmido de 91 Kb daba lugar a una banda de 200 pb y que en pFM82139 hizo aumentar el fragmento *Hind*III correspondiente a pMJ005 en 200 pb. Posteriormente se analizó por restricción el clon pFM003, que comprendía esta zona extrema de pMJ005, y se confirmó la desaparición del punto de corte *Hind*III. Puesto que el patrón de restricción del inserto *Hind*III de pMJ005 era muy similar (con la excepción de la desaparición del punto de corte *Hind*III y de otro *Eco*RV) a la de la zona homóloga

de pFM501, podíamos suponer que la conservación de la secuencia entre ambos plásmidos de virulencia se mantenía hasta esta zona.

Cada uno de los fragmentos *Hind*III de pFM82139 correspondientes a los clones pMJ002B y pMJ006, también contiguos, hibridaron con sendos fragmentos *Hind*III de mayor tamaño de pFM501, lo que indicaba la existencia de una posible delección en esta zona del plásmido de virulencia de *S. enteritidis*, delección ya apuntada por Montenegro *et al.* (1991) y que daba cuenta de las 30 kb de diferencia entre ambos plásmidos. El hecho comentado en el apartado anterior de la hibridación de DNA proveniente del fragmento *Hind*III-*Sal*I de pMJ006 contiguo a pMJ005 con bandas *Sal*I de pFM501 y pFM82139 de idéntico tamaño y de la hibridación de DNA del otro extremo con una banda *Sal*I de pFM501 de gran tamaño y con otra menor de pFM82139 delimitaba aun más la extensión de dicha delección puesto que se podía aseverar que la región más conservada de pFM82139 con respecto a pFM501 llegaba hasta el punto de corte *Sal*I del fragmento *Hind*III de pMJ006 e incluía los fragmentos *Hind*III vecinos a este correspondientes a pMJ005, pMJ001, pMJ004 y pMJ002A.

El inserto *Hind*III de pMJ003 hibridó con dos fragmentos *Hind*III de menor tamaño del plásmido de *S. typhimurium* JR501 cuya suma era igual a la del fragmento de pFM82139. Al analizar los mapas de restricción de ambas zonas fue fácil deducir que lo que había ocurrido era la desaparición de un punto de corte *Hind*III en pFM82139 y aunque se encontró una mayor diferencia en el patrón de restricción de ambas zonas que el encontrado en el caso de pMJ005 y su fragmento homólogo, se consideró que se podía incluir este fragmento *Hind*III dentro de los pertenecientes a la zona más conservada de pFM82139 (Figura 3.22).

### 3.3.- Localización de algunos genes implicados en la virulencia de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*.

Se planteó a continuación la localización de una serie de genes plasmídicos que habían sido implicados en la virulencia de otros serovares de *Salmonella* y que, excepto en uno de los casos (*rock*), no había sido notificada su presencia o ausencia en el plásmido de virulencia de *S. enteritidis*. Para llevar a cabo este análisis se utilizó la amplificación por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de DNA de pFM82139, la cual permitiría detectar secuencias homólogas a algunos de estos *loci* relacionados con la virulencia tales como *rock*, *traT* y *vagC/vagD*.

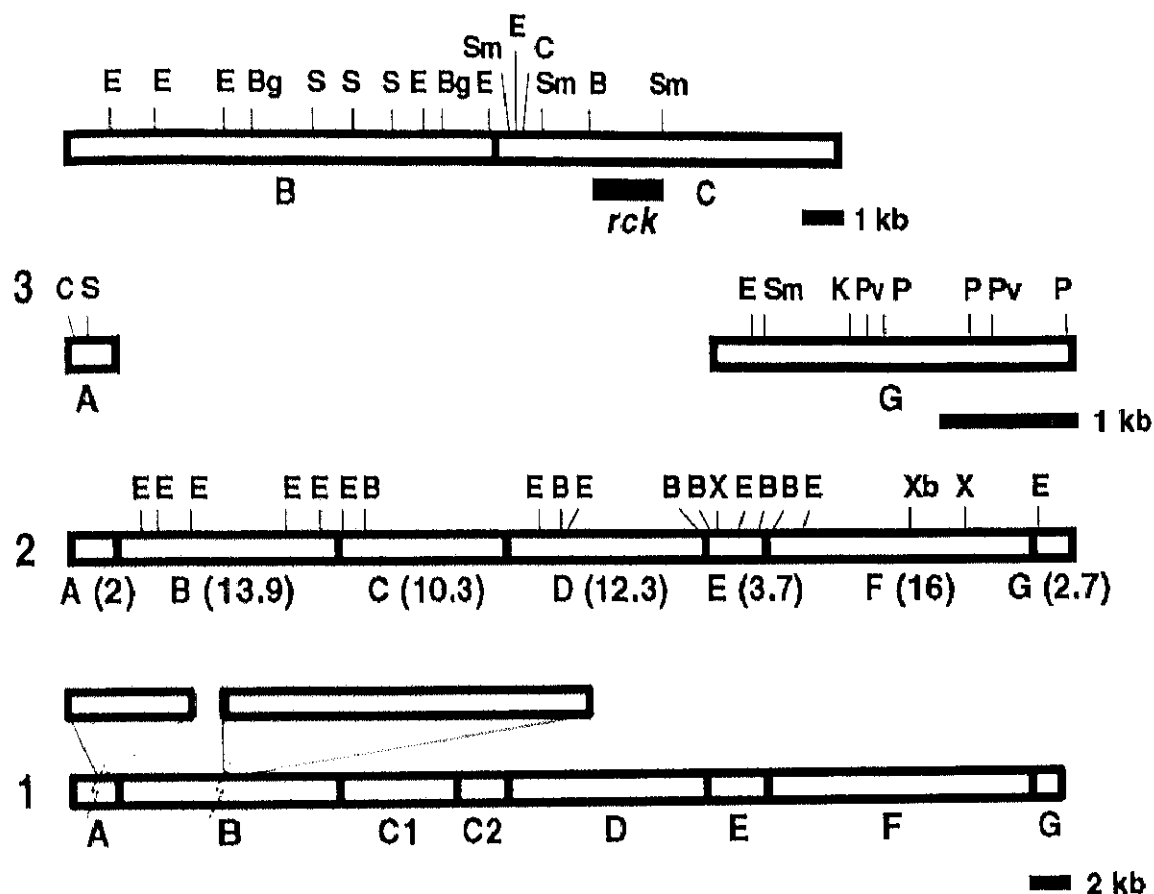
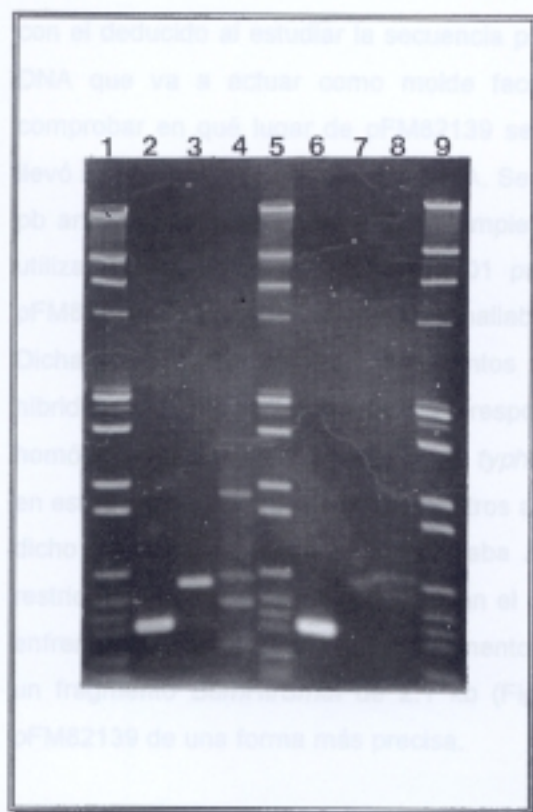


Figura 3.22.- Mapas de restricción de los plásmidos pFM501 (1) y pFM82139 (2) que muestran los fragmentos *Hind*III. Los números entre paréntesis indican el peso molecular de los fragmentos en kb; los rectángulos situados sobre el mapa del plásmido de *S. typhimurium* representan las regiones no homólogas contenidas en esos fragmentos, pero no su localización exacta. (3) Mapa detallado de los fragmentos A (pMJ006), B (pMJ002B), C (pMJ003) y G (pMJ005) del plásmido de *S. enteritidis*. Los fragmentos D, E y F de pFM82139 corresponden a los clones pMJ002A, pMJ004 y pMJ001 respectivamente. El rectángulo sombreado situado bajo el fragmento C señala la homología con la sonda *rck* (como se explicará más adelante). Los puntos de corte de las distintas endonucleasas de restricción empleadas se indican con las letras: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; C, *Cla*I; E, *Eco*RI; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; Pv, *Pvu*II; S, *Sal*I; Sm, *Sma*I; X, *Xho*I; Xb, *Xba*I.

Se diseñaron en primer lugar una serie de oligonucleótidos basados en las secuencias ya publicadas de estos genes. Para cada gen se eligió una pareja de oligonucleótidos que comprendiera un fragmento de DNA lo suficientemente grande como para poder ser detectado sin dificultad en un gel de agarosa. Se estudió en cada caso la temperatura de desnaturalización más adecuada y la posible formación de bucles internos o apareamientos de cada oligonucleótido.



**Figura 3.23.-** Electroforesis en gel de agarosa del 1% de los productos de amplificación por PCR de pFM501 (carriles 2, 3 y 4) y de pFM82139 (carriles 6, 7 y 8) empleando cebadores correspondientes a *rck* (carriles 2 y 6), *traT* (carriles 3 y 7) y *vagC/vagD* (carriles 4 y 8). Los carriles 1, 5 y 9 contienen los patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales).

### 3.3.1.- Detección del gen *rck*.

Se estudió en primer lugar el gen *rck* (resistance complement killing). Este gen, que como su nombre indica está implicado en la resistencia de *Salmonella* a la acción lítica del complemento, ha sido ampliamente estudiado en el serovar Typhimurium y detectado por Heffernan *et al.* (1992) mediante hibridaciones por la técnica de Southern en los plásmidos de virulencia de *S. enteritidis* y *S. dublin*. No obstante, estos autores no han detallado el lugar que dicho gen ocupa en el plásmido de virulencia objeto de este trabajo, por lo que pareció oportuna su localización.

Tomando como punto de partida la secuencia ya publicada del gen *rck* de *S. typhimurium* (Heffernan *et al.*, 1992), se diseñaron los siguientes oligonucleótidos teniendo en cuenta las premisas, en cuanto a características de los mismos, anteriormente citadas:

5'-CCTGAAATACCGCTATGAGG-3'

5'-GAACCGGTAACCGACACC-3'

Estos cebadores, tanto al utilizar como molde DNA de pFM82139 linealizado con *Xba*I, como DNA del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* JR501, pFM501, linealizado también con *Xba*I (control positivo) permitieron amplificar un fragmento de DNA cuyo tamaño, de 400 pb, era acorde

con el deducido al estudiar la secuencia publicada de *rok* (Figura 3.23). El hecho de linearizar el DNA que va a actuar como molde facilita la reacción de polimerización en cadena. Para comprobar en qué lugar de pFM82139 se encontraba localizada esa región homóloga a *rok* se llevó a cabo una hibridación DNA-DNA. Se preparó una sonda constituida por el fragmento de 400 pb amplificado a partir de pFM501 empleando los oligonucleótidos anteriormente reseñados. El utilizar como molde DNA de pFM501 para la obtención de la sonda, en lugar de DNA de pFM82139, aseguraba que ésta se hallaba constituida única y exclusivamente por el gen *rok*. Dicha sonda se enfrentó a los distintos clones pMJ digeridos con *HindIII*. Se comprobó que hibridaba con el fragmento *HindIII* correspondiente a pMJ003 además de con el fragmento *HindIII* homólogo del plásmido pFM501 de *S. typhimurium*, lo cual corroboraba la localización del gen *rok* en este último plásmido descrita por otros autores (Figura 3.24). Para delimitar aún más la zona de dicho fragmento en que se encontraba *rok* se digirió el clon pMJ003 con las enzimas de restricción *BamHI* y *SmaI*, que dividían el clon en cinco fracciones claramente distinguibles, y se enfrentó a la misma sonda del experimento anterior. Se observó la hibridación de dicha sonda con un fragmento *BamHI/SmaI* de 2.1 kb (Figura 3.25) lo que sirvió para situarlo en el mapa de pFM82139 de una forma más precisa.

### 3.3.2.- Detección del gen *traT*.

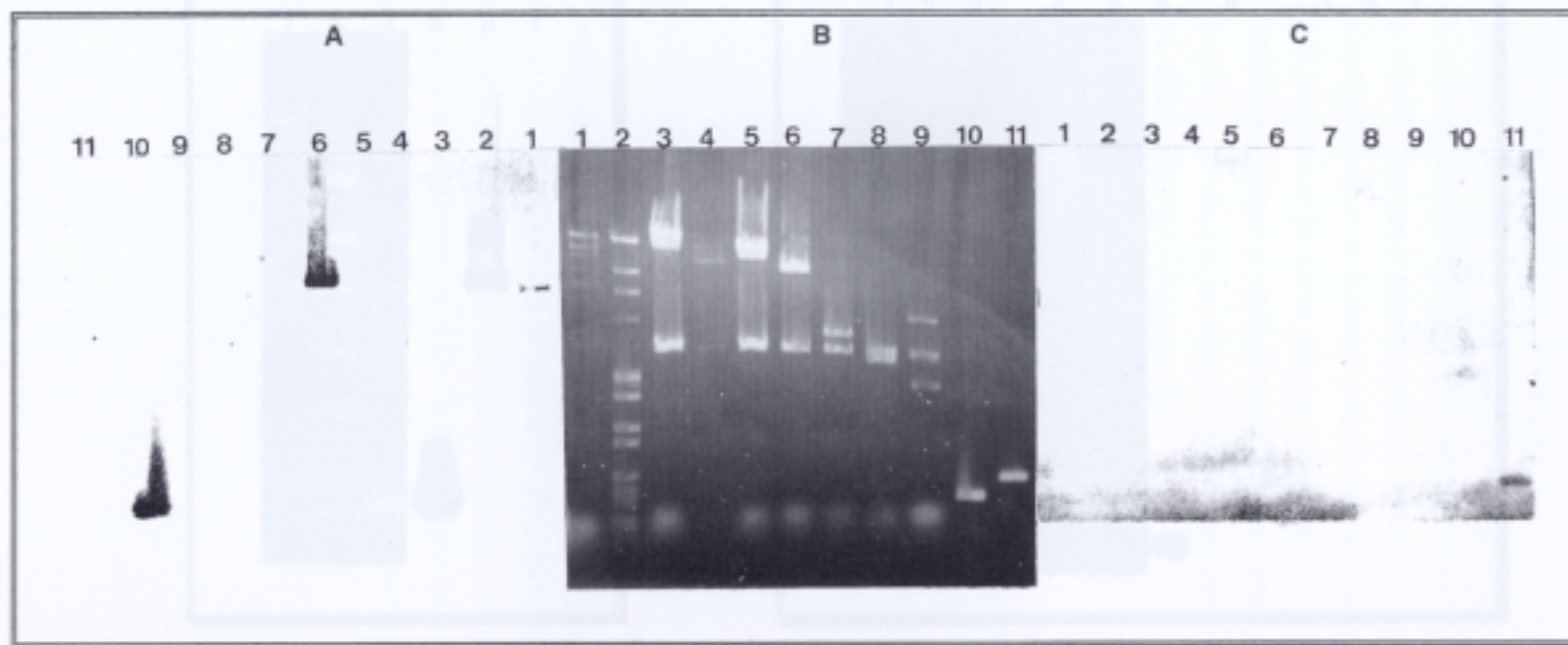
El siguiente gen objeto de estudio fue el gen *traT*. Este gen que forma parte del operón de transferencia de los plásmidos del tipo F y que codifica para una lipoproteína, solamente ha sido descrito en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* (Rhen *et al.*, 1988) y parece ser que le confiere cierta resistencia al suero.

Para detectar *traT*, cuya secuencia también había sido publicada en *S. typhimurium* por Sukupolvi *et al.* (1990) se emplearon los oligonucleótidos:

5'-GGGTGTGGTGGATGAGC-3'

5'-GGCATTGATACCACACG-3'





**Figura 3.24.- (B)** Electroforesis en gel de agarosa del 1% de DNA digerido con *Hind*III de (1) pFM82139, (3) pMJ001, (4) pMJ002A, (5) pMJ002B, (6) pMJ003, (7) pMJ004, (8) pMJ005 y (9) pMJ006. En los carriles 10 y 11 productos de la amplificación por PCR de pFM501 utilizando cebadores correspondientes a *rck* y *traT* respectivamente. En el carril 2, patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales). (A) y (C) Hibridaciones del DNA empleando como sondas los fragmentos que aparecen en los carriles 10 (sonda *rck*) y 11 (sonda *traT*) respectivamente. En el carril 2 patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales)



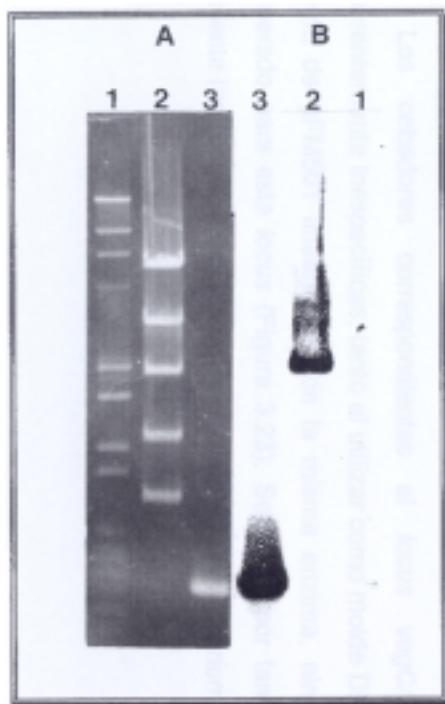


Figura 3.25

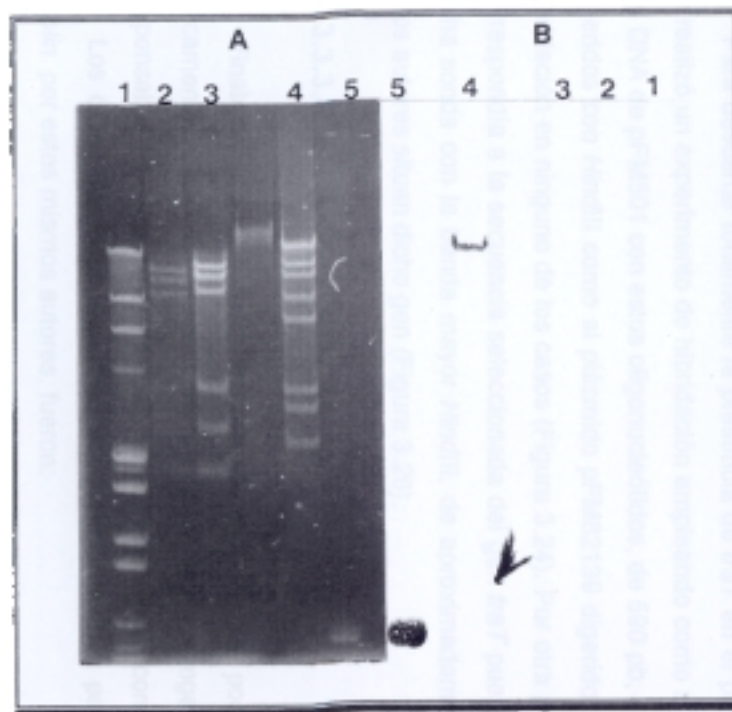


Figura 3.26

**Figura 3.25.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa del 1 % de (1) patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales), (2) pMJ003 digerido con *Bam*HI-*Sma*I y (3) producto de la amplificación por PCR de pFM82139 utilizando cebadores correspondientes a *rck*. (B) Hibridación del DNA empleando como sonda el fragmento que aparece en el carril 3 (sonda *rck*).

**Figura 3.26.-** (A) Análisis electroforético en gel de agarosa del 1% de (1) patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales), (2) y (3) pFM82139 digerido con *Hind*III, (4) pFM501 digerido con *Hind*III y (5) producto de la amplificación por PCR de pFM501 utilizando cebadores correspondientes a *traT*. (B) Hibridación del DNA empleando como sonda el fragmento que aparece en el carril 5 (sonda *traT*)

De la misma manera que en el caso anterior se utilizó como DNA molde tanto DNA de pFM82139 como DNA de pFM501 (como control positivo) ambos linearizados con *Xba*I. No se pudo detectar amplificación utilizando los oligonucleótidos correspondientes al locus *traT* en el caso de pFM82139 aunque sí en el de pFM501. El tamaño de la banda amplificada en este último caso era acorde con el del fragmento de DNA de la secuencia de *traT* publicada que abarcaban los dos oligonucleótidos diseñados (Figura 3.23).

Para descartar totalmente la presencia de *traT* en el plásmido de virulencia de *S. enteritidis*, se realizó un experimento de hibridación empleando como sonda el fragmento amplificado a partir del DNA de pFM501 con estos oligonucleótidos, de 590 pb, y enfrentándolo tanto a los clones pMJ digeridos con *Hind*III como al plásmido pFM82139 digerido con la misma enzima. No se detectó hibridación en ninguno de los casos (Figura 3.24). Por otra parte se verificó que la sonda utilizada correspondía a la secuencia seleccionada del gen *traT* puesto que se comprobó la hibridación de dicha sonda con la banda mayor *Hind*III, de aproximadamente 35 kb de pFM501, lugar en que otros autores sitúan dicho gen (Figura 3.26).

### 3.3.3.- Detección de *vagC/vagD*.

Finalmente nos pareció interesante estudiar la posible localización de un locus que únicamente había sido descrito en *S. dublin* por Pullinger y Lax (1992), el locus *vagC/vagD*, responsable del control de la división celular bajo ciertas condiciones de escasez de nutrientes.

Los oligonucleótidos diseñados para *vagC/vagD*, a partir de la secuencia publicada en *S. dublin* por estos mismos autores, fueron:

5'-GAGGGGGTGAGCGAGC-3' (del ORF 1 o *vagC*)

5'-CACCGCTTCCGACTGC-3' (del ORF 2 o *vagD*)

Los cebadores correspondientes al locus *vagC/vagD* amplificaron varias bandas, aparentemente inespecíficas, tanto al utilizar como molde DNA de pFM82139 linearizado con *Xba*I como de pFM501 linearizado con la misma enzima, ninguna de las cuales era del tamaño esperado para este locus (Figura 3.23). Se podía por tanto afirmar que este locus se hallaba ausente tanto en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* como en el de *S. enteritidis*.

### 3.4.- Resistencia al suero.

Como ya se comentó en la introducción, la resistencia a la acción lítica del complemento, comunmente conocida como resistencia al suero, es uno de los factores de virulencia de *Salmonella* atribuido en parte a la posesión del plásmido.

Dado que de los dos genes del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* descritos en la literatura como implicados en la resistencia al suero, *traT* y *rok*, únicamente éste se encontraba en el de *S. enteritidis*, pareció interesante comprobar su posible funcionalidad.

Como demostramos anteriormente, el gen *rok* se hallaba situado en el fragmento *HindIII* del clon pMJ003, concretamente en el fragmento *BamHI-SmaI* de 2.1 kb.

Analizamos en primer lugar la capacidad del clon pMJ003 de conferir resistencia al suero a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  empleando como control negativo el propio vector de clonación pBluescript SK. El suero utilizado en este y en los demás ensayos provenía de la mezcla de 10 muestras distintas de suero humano. En un primer ensayo, realizado como se detalla en el apartado de Métodos, se incubaron cinco diluciones decimales de las suspensiones celulares en presencia de un 50% de suero humano normal e inactivado. En presencia de suero humano normal no se observó crecimiento alguno, en ninguna de las diluciones, ni de la cepa que contenía pMJ003 ni de la que portaba el control. Por ello, en un segundo ensayo, se redujo la concentración de suero hasta un 10%. Los resultados se muestran en la Tabla 3.1.

	pBluescript SK	pMJ003
log kill	3.55	3.58

**Tabla 3.1.-** Efecto de los plásmidos pMJ003 y pBluescript SK en la resistencia al suero de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Los valores representan el log kill (ver Métodos) de cada cepa en presencia de un 10% de suero humano.

Esta diferencia inapreciable entre ambos log kill reflejaba un comportamiento similar de las cepas portadoras de ambos plásmidos frente al suero.

Con el objeto de discernir si el gen *rok* del plásmido pFM82139 únicamente ejercía su efecto frente a la vía alternativa del complemento, se eliminaron del suero humano utilizado los posibles anticuerpos frente a *E. coli* que pudiera haber, sometiéndolo al tratamiento que se detalla en la sección de Métodos. Los resultados obtenidos, después de realizar un experimento en las mismas condiciones, fueron de la misma magnitud que en el caso anterior.

Todo ello llevó a la conclusión de que el gen *rok* de *S. enteritidis* no era funcional al menos en *E. coli*.

### 3.5.- Estudio de las regiones implicadas en replicación, mantenimiento e incompatibilidad de pFM82139.

#### 3.5.1.- Estudio de los mecanismos de replicación del plásmido pFM82139.

Dentro de los genes relacionados con el mantenimiento del plásmido desempeñan una función esencial aquellos implicados directamente en la replicación del mismo. En *S. typhimurium* han sido descritos dos regiones responsables de la replicación del plásmido de virulencia: *repB*, que presenta una débil hibridación con plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncFII, y *repC*, que muestra una débil hibridación con plásmidos pertenecientes al grupo IncFI (Tinge y Curtiss, 1990a). Estas mismas regiones han sido detectadas por hibridación, aunque no estudiadas, en el serovar Enteritidis. Se planteó la caracterización de las mismas tanto desde un punto de vista estructural como funcional. Para ello, se procedió en primer lugar a su clonación, posteriormente a su secuenciación y finalmente se realizaron una serie de estudios relacionados con su estabilidad.

##### 3.5.1.1.- Clonación de las regiones de replicación de pFM82139.

Para la clonación de las regiones de replicación del plásmido pFM82139 de *S. enteritidis* se partió de la localización que de las mismas habían hecho otros autores en el plásmido de *S. typhimurium*, tomando como referencia los mapas de restricción de ambos plásmidos. El objetivo era la obtención de unas construcciones cuya replicación se debiera únicamente a la posesión de dichos replicones y que tuvieran un marcador de selección adecuado.

##### 3.5.1.1.1.- Clonación de *repB*

Para abordar la clonación de *repB* se partió de los clones pMJ002B y pMJ003, ya que por analogía con el mapa de pFM501 era muy probable que el replicón ocupara parte del fragmento *HindIII* de 12.9 kb de pMJ002B y parte del fragmento *HindIII* de 10.3 kb de pMJ003 (Tinge y Curtiss, 1990a). Previamente se había comprobado la existencia de un promotor y un ATG en la zona terminal del inserto *HindIII* de pMJ002B contiguo al de pMJ003, mediante fusión del fragmento de 400 pb *EcoRI-HindIII* situado en el extremo de dicho inserto con el gen *lacZ* del vector de clonación YEp357. A la vista de la situación de *repB* en el mapa del plásmido de virulencia de *S. typhimurium*, era bastante probable que el citado promotor fuera el de dicho replicón. Para demostrar la presencia del replicón se optó por construir un miniplásmido formado únicamente por el fragmento en que se suponía que contenía *repB* y un gen de resistencia a antibióticos, y comprobar su autorreplicación. Como fuente del marcador de resistencia a

antibióticos se utilizó el vector de clonación pBluzK, que contenía el gen de resistencia a kanamicina.

En primer lugar hubo de construirse un nuevo clon que englobara el replicón RepB completo. Para ello se digirió pMJ002B con *EcoRI*, se electroeluyó la banda de 3.4 kb y se religó. Esta construcción contenía el vector pBluescript SK y un fragmento de *repB* de aproximadamente 400 pb que teóricamente constituía la parte inicial del gen. Posteriormente se linearizó con *HindIII* y se ligó al inserto de 10.3 kb *HindIII* de pMJ003, que contenía el resto del replicón. Como dicho fragmento *HindIII* de 10.3 kb podía haber entrado en las dos orientaciones posibles, se analizaron una serie de clones por restricción con *EcoRI*, *SmaI*, *BglII* y *BamHI* y se eligió uno de ellos que presentaba la orientación correcta, es decir, la que correspondía al patrón de restricción de la zona del plásmido de *S. typhimurium* que englobaba la región de replicación *repB*. A este clon se le denominó pFMRepB.

Una vez que se dispuso de la región *repB* completa, la siguiente etapa fue la eliminación del replicón de tipo ColE1, que aportaba el vector de clonación pBluescript SK, con objeto de poder detectar la funcionalidad del primero. Puesto que dadas las características de pFMRepB, la eliminación del replicón de tipo ColE1 significaba también la pérdida del marcador de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, fue necesario incorporar un nuevo marcador de selección.

En primer lugar se digirió pFMRepB con *BamHI* y se electroeluyó el fragmento de 2.8 kb, con lo cual, además de eliminar por completo el vector pBluescript SK, se eliminó una gran parte del inserto que teóricamente no formaba parte de *repB*. Para dotar a dicho replicón de un marcador de selección, se ligó el fragmento *BamHI* de 2.8 kb que lo contenía al vector pBluzK, previamente digerido con *BamHI* y convenientemente desfosfatizado. Este vector, además del gen que codifica  $\beta$ -lactamasa y de un gen de resistencia a kanamicina, contiene el gen *lacZ* bajo un promotor del operón *trp*, que podía ser útil a la hora de valorar el número de copias del replicón mediante técnicas de citofluorimetría. Se obtuvieron dos construcciones, denominadas pBluzKRB y pBluzKRB2, correspondientes a las dos orientaciones posibles en que podía entrar el fragmento *BamHI* de 2.8 kb. El siguiente objetivo fue la eliminación del replicón de tipo ColE1 por la misma razón que se explicó anteriormente. Para ello se digirió cada una de las construcciones anteriores con las enzimas *SalI* y *XbaI* y se electroeluyó la banda de aproximadamente 8.2 kb que contenía el replicón RepB, el gen de resistencia a kanamicina y el gen *lacZ*. Para poder circularizar este fragmento se utilizó una zona de 63 pb de extremos *SalI*-*XbaI* obtenida del sitio de clonación múltiple del vector pBluescript SK. Como no era posible la electroelución de un fragmento tan pequeño, los productos obtenidos de la digestión con dichas enzimas del vector pBluescript SK se ligaron al fragmento de 8.2 kb. Las construcciones posibles a las que podía dar lugar dicha ligación eran dos: una que poseyera únicamente el fragmento de 8.2 kb circularizado gracias al fragmento del "sitio de clonación múltiple" insertado, que era la que se perseguía, y otra que tuviera insertado dicho fragmento de 8.2 kb dentro del vector pBluescript. Los transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  se

seleccionaron en placas de LB-kanamicina, y con el objeto de seleccionar aquellos que tuvieran la construcción que se buscaba se realizaron réplicas de las colonias obtenidas en placas de LB-Km y en placas de LB-Ap. Aquellas réplicas que crecieran en presencia de kanamicina y no lo hicieran en presencia de ampicilina eran las que contenían la construcción correcta, que además del gen de resistencia a kanamicina y del gen *lacZ* era capaz de autorreplicarse gracias a la actividad del replicón RepB. Posteriormente se extrajo el DNA de esas réplicas y al analizar su perfil de restricción se comprobó que se tenían los dos tipos de construcciones, correspondientes a las dos construcciones pBluzKRB de las que se había partido, cada una con la región de replicación *repB* en distinta orientación. A una se la denominó pRepBK y a la otra pRepBK2. (Figuras 3.27 y 3.28)

#### 3.5.1.1.2.- Clonación de *repC*

Para la clonación de *repC* se siguió un procedimiento similar al de la clonación de *repB*. Se compararon los mapas de restricción de la zona del plásmido de *S. typhimurium* que contenía dicho replicón con la correspondiente de *S. enteritidis*. Como resultado de este estudio se supuso que la región de replicación *repC* estaría localizada dentro del fragmento *HindIII* correspondiente a pMJ002A (clon que a partir de ahora recibirá el nombre de pFMRepC puesto que contiene dicho replicón), concretamente entre los puntos de corte *BglII* y *SalI*. Para separar el fragmento de DNA que contenía *repC* del vector pBluescript SK y del resto del fragmento *HindIII* de pFMRepC que no tenía interés, se digirió dicho clon con las enzimas *BglII* y *SalI* y se electroeluyó la banda de 4.7 kb que teóricamente contenía el replicón.

Con objeto de proporcionarle un marcador de selección, se ligó dicha banda de 4.7 kb al fragmento *BamHI-SalI* de 5.2 kb del vector pBluzK, fragmento que contenía los genes de resistencia a kanamicina y *lacZ*, gen este último que, como se comentó anteriormente podía ser útil en la valoración del número de copias del replicón por citofluorimetría. Se verificó que dicha construcción, a la que se denominó como pRepCK, era capaz de autorreplicarse en *E.coli* DH5 $\alpha$  en presencia de kanamicina. Puesto que la ligación de los extremos producidos por *BamHI* y *BglII* hacía desaparecer el punto de corte para ambas enzimas y esto impedía asegurar que la clonación se había realizado de forma correcta, se comprobó que el perfil de restricción de la construcción pRepCK era acorde con el del conjunto de los elementos que formaban parte de ella (Figura 3.28).

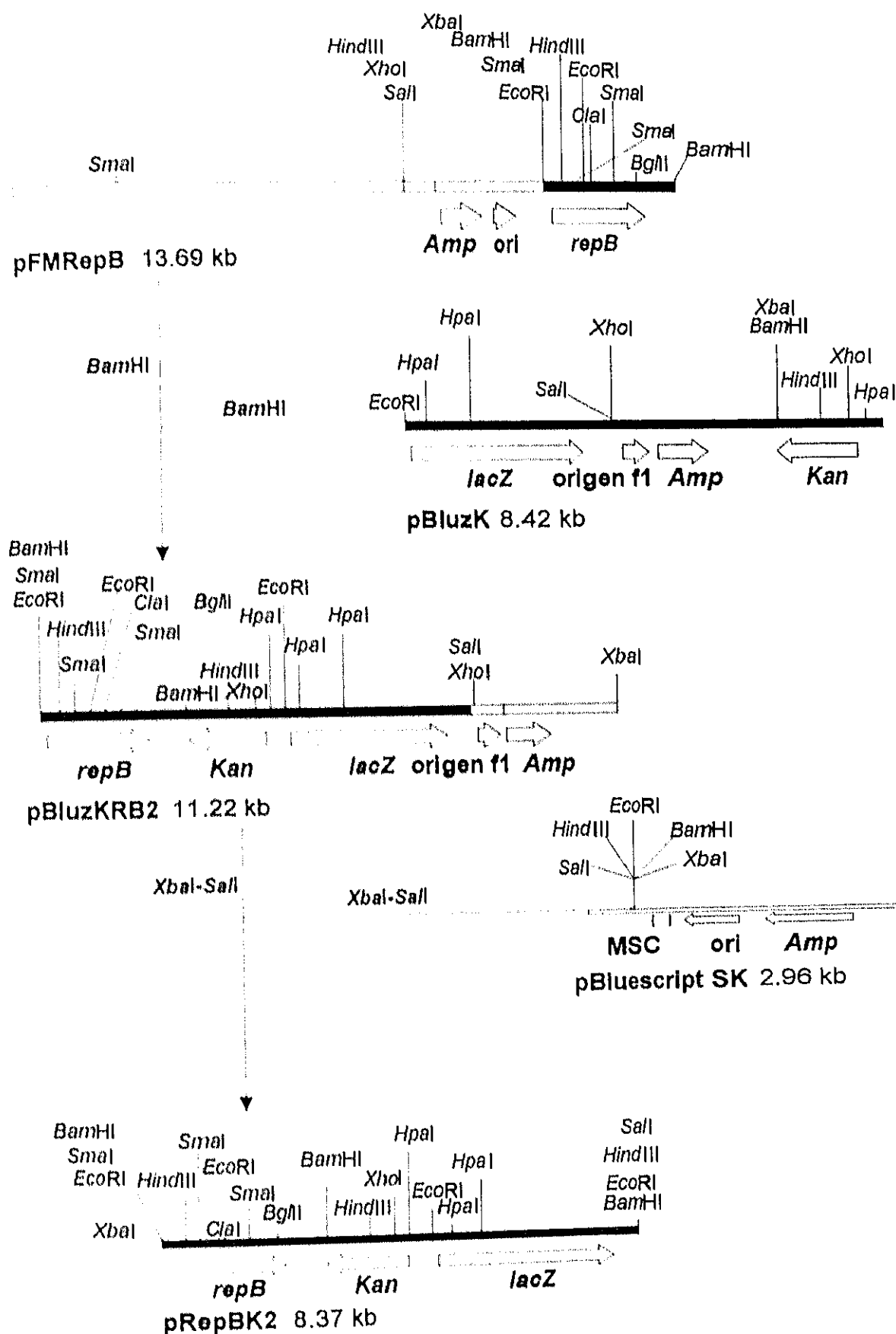


Figura 3.27.- Esquema de la construcción de pRepBK2. Los fragmentos eliminados en cada clonación aparecen en blanco.

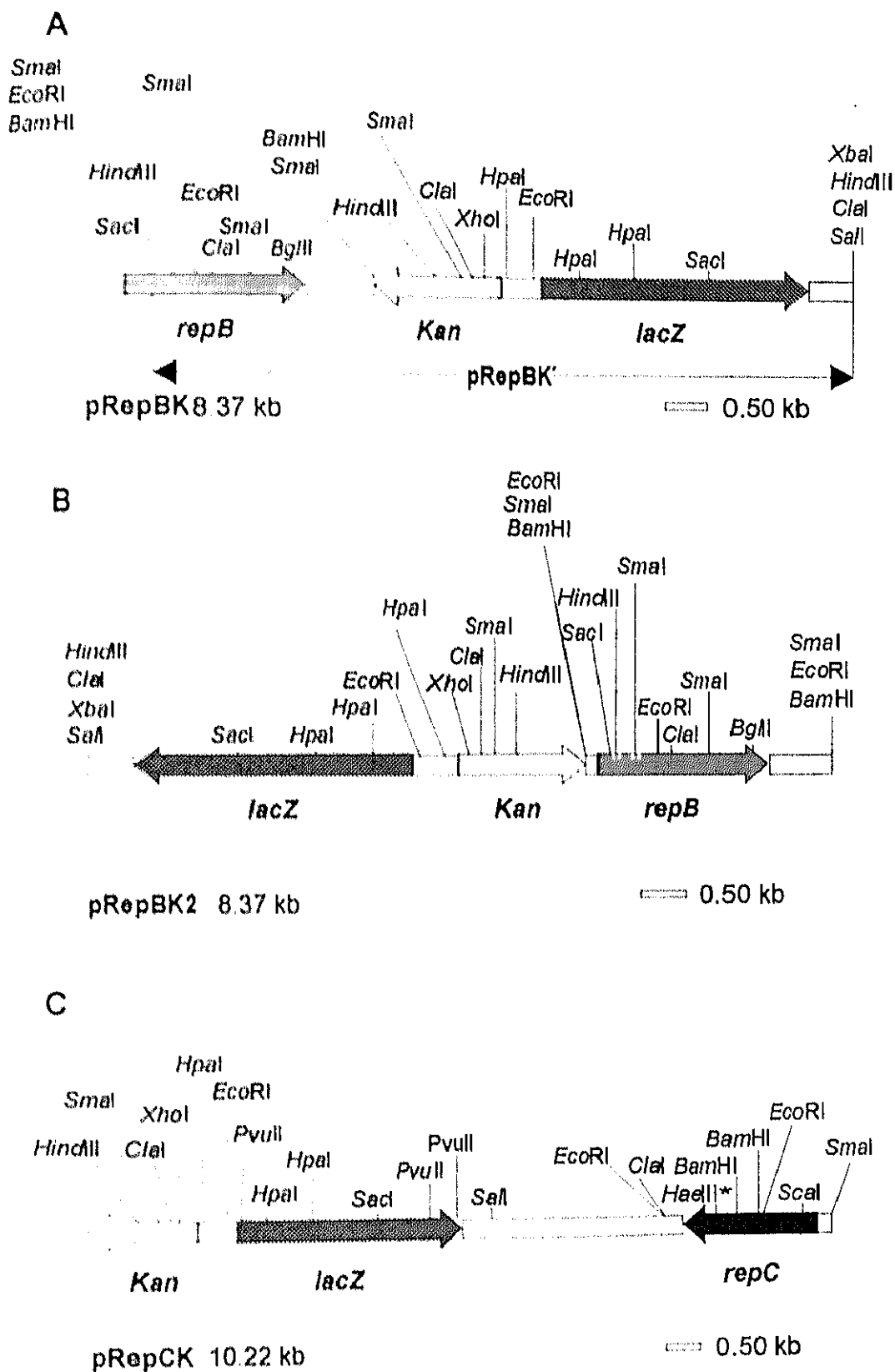


Figura 3.28.- Mapa de restricción de los clones (A) pRepBK, indicándose la extensión de pRepBK', (B) pRepBK2 y (C) pRepCK.  
(\*) *HaeIII* sólo está caracterizada en ese punto.



### 3.5.1.2.- Secuenciación de los replicones RepB y RepC.

A continuación se procedió a la secuenciación de ambas regiones de replicación. Los resultados obtenidos se refieren a una sola cadena de DNA y están, por tanto, pendientes de la comprobación mediante la secuenciación de la segunda cadena.

#### 3.5.1.2.1.- Secuenciación de RepB

Tomando como referencia las observaciones realizadas por Tinge y Curtiss (1990a) en las que señalaban la existencia de una débil hibridación entre el replicón RepB de *S. typhimurium* y el plásmido de tipo IncFII R100, pareció oportuno determinar la homología de secuencia nucleotídica entre la región de replicación *repB* de *S. enteritidis* y el origen de replicación de tipo IncFII de R100. Para ello se efectuó el análisis de las secuencias nucleotídicas de los distintos subclones que comprendían todo el replicón (Figura 3.29)

vez obtenida la secuencia, que se suponía contenía todo el replicón, y utilizando el programa FASTA, se analizó en los bancos de datos internacionales del E.M.B.L. con el fin de comprobar si los resultados de este análisis se correspondían con los datos obtenidos por Tinge y Curtiss (1990a) en estudios de hibridación. Efectivamente, se constató la existencia de un grado de homología del 69% con la secuencia nucleotídica del origen de replicación del plásmido R100 de *E.coli*, plásmido perteneciente al grupo IncFII de incompatibilidad de cuyo mecanismo de replicación ya se trató en el apartado de la Introducción. No obstante, esta homología era aún mayor con el replicón del plásmido pYVe439-80 de *Yersinia enterocolitica*, alcanzando el 72.5%. La similitud entre la secuencia del replicón *repB* de pFM82139 con las secuencias ya publicadas de los anteriores (Womble *et al.*, 1985, Vanooteghem y Cornells, 1990) sirvió para localizar en el mismo tanto el origen de replicación como las distintas regiones responsables de la codificación y regulación de las proteínas implicadas en dicho proceso (Figuras 3.30 y 3.31).

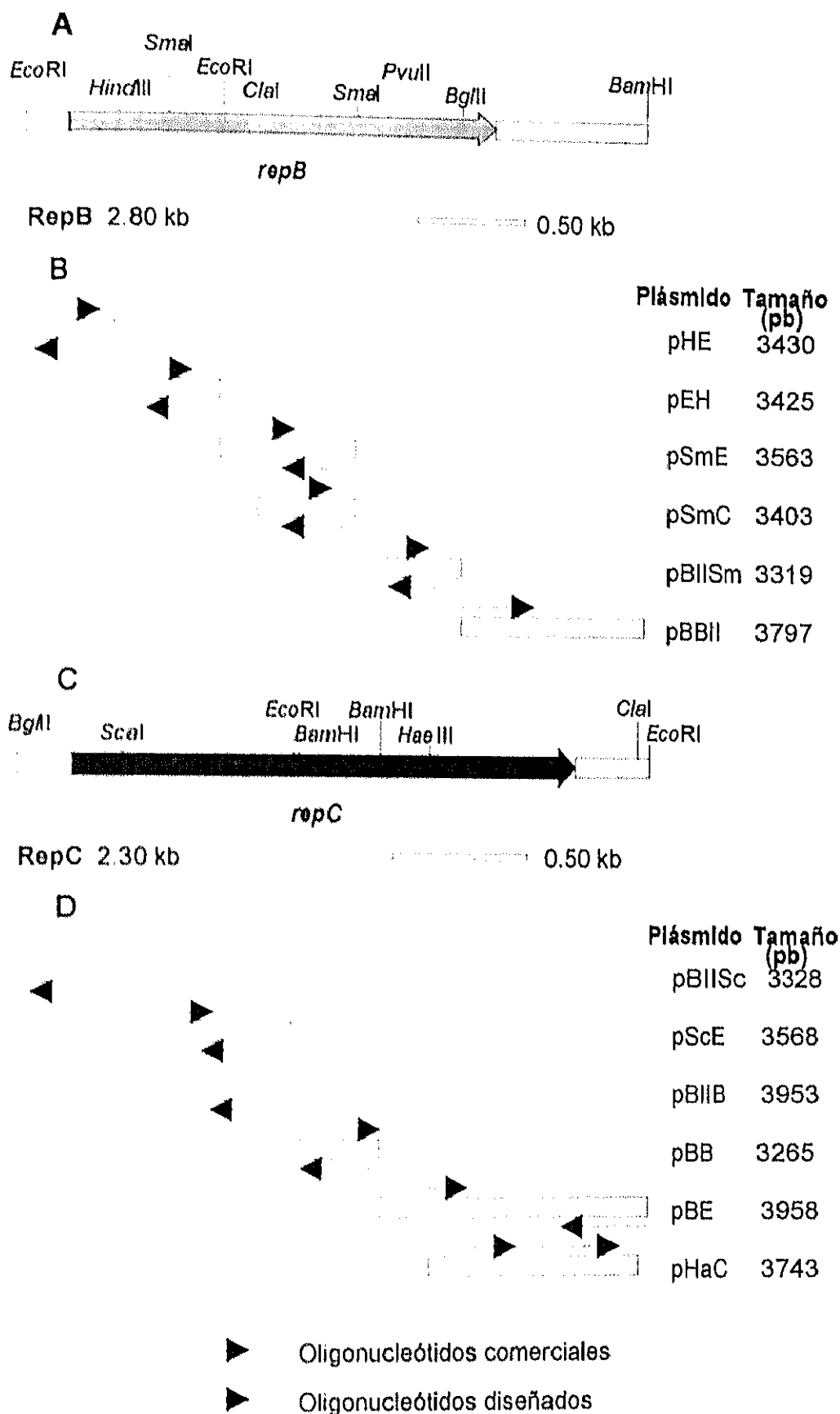


Figura 3.29.- A-Mapa de restricción de RepB.

B-Fragmentos de RepB clonados en pBluescript SK y estrategia de secuenciación de los mismos

C-Mapa de restricción de RepC.

D-Fragmentos de RepC clonados en pBluescript SK y estrategia de secuenciación de los mismos..

pFM82139	AACTACAGCTTACGTTTCATAAAGTAAGTTCGCTGATTTTATAGAAATCTGTAGT -50
	-35
pFM82139	ATTCCTCTGCAAAAGATCTACGTTTCGATCCCTTGAGGAGACAGAGATGTCGC -100
pYVe439-80	TGCTTCGAGCTTTTGAGGGGGCTGAGATGTCGC -32
	10 S/D RepB Inicio RepB
pFM82139	AGATTCGAAAAATGCACTAACTTCCTCATCGAAACGCATTTACAGAAAGGGT -150
pYVe439-80	AGATTCGAAAAATGCACTAACTTCCTCATCGAAACGTGCGCTACAGAAAGGGG -82
pFM82139	AATCCCTTATCTTTCGCTGAGAGAAGAGATTTATCTATTTTCACGAAAAAA -200
pYVe439-80	AATCCCTTAACTTGAGCTGAGAAACAACGTTATGTCTGTTTCCCGGAAAAA -132
pFM82139	GACGACGCTATAAAGAGCTCAATCTTTTCATACAAAACATACATAAAGA-- -248
pYVe439-80	AGAGACACATAAAGCTATAAATCTGCTTCATTCAGAACGATCTCAAAAACG -182
	HindIII
pFM82139	AAGCTTACAGCTAGCTTTCTGGAAGAGACTGGAAGTACTCAGGCTCAAATGAT-299
pYVe439-80	AACTTTTACAACCTCTGAGAGATTCAGGTTTGACTCAGACAGAAATGAT-231
pFM82139	TGAGCTACTTAATTAAGCTGAAAAAGCTTAAAAAGAGCC--TG-AGATAAGA -346
pYVe439-80	TGAGCTCTGATTCAGAGAGAAAAAGGCGCTAGGACTAATGCAGCTTGAA -281
	Fin RepB
pFM82139	AGCTCAATGAGTTAACTTTCTTGATCTCTCGTCAGTGAGTGTAGATTGC -396
pYVe439-80	TGCTAACTAACTTACTTTCTTGATCTCTCAGGCAGTGAGTGCTAGATTAC -331
	-35 repA -10repA
pFM82139	TGATCTCTTAAAGAATTTTGATGCTTGGCCACGCCGTAAGGTGGCAGGGA -446
pYVe439-80	CGATCTCTTAAAGAATTTT--TGCTTGGCCACGCCGTAAGGTGGCAGGGA -379
	->Inicio mRNA repA
	SmaI
pFM82139	ACTGCTTCTGATGAGCTTCTTACCCGGGACCAGAAAGCAAAAACCCCGA -496
pYVe439-80	ACTGCTTCTGATGAGCTTCTTACCTTGAACAGAAAGCAAAAACCCCGA -429
	Fin RNA-1 <-
pFM82139	TAATTTCTCATTTCTTAAAGGAGAAAGATTAACGGGGCCCTACTTAA-546
pYVe439-80	TAAACTTCTCATTTT- TTAGCTGAGCTGAGAAAGTTACCGGGGCCCACTTAA-479
pFM82139	ACTGTATAGCAACCAATCAGGCTATGACGGGAGTATAGTTTATGCTCAG -596
pYVe439-80	AACTGTATAGCAACCTGTTTCTCTATACAGGGAGTATATGTGCATGCTCAG -529
	Inicio RNA-1<- S/D -10 RNA-1 Inicio
	tap tap
pFM82139	AAAAATTCCTAATACCTTCTTCTCTGCGCATTTACTCCTTCCGTGCATTTGTAA -646
pYVe439-80	AAAAATTCCTAATACCTTCTTCTCTGCGCATTTACTCCTTCCGTGCAACATAA -576
	VRNA-1





pFM82139	CACAGCTTACCTTCATAAACTAAGTCGCTGATTTT <u>AGAAATCTGTAGTAT</u>	-50
R100	II II II IIIIIIIIIII II III IIIIIIIII GATCTTCGTACAAATCTCAAGTCGCTGATTTCAAAAACTGTAGTAT	-48
	-35 repA2 -10 repA2	
pFM82139	TCCTTCCTAAACGATCTAGCTTTGATCCTTGAGGAGACAGAGATGTTCGCA	-99
R100	IIIIII IIIIIIIII IIIIIII IIIIIII II IIIIIIIIIII CCCTTCCTGAAAAGATCCCTCTTTGAGTATTGAGGAGGCCG-AGATGTTCGCA	-97
	S/D repA2 Inicio RepA2	
pFM82139	GATTCGAAAAATCTAGTAACTTCCTCATC-G-----AAACGCATTTACAGAA	-143
R100	II IIIIIIIII IIIIIIIII II III IIIIIIIII GATTCGAAAAATCTAGTAACTTCCTCATCTGGCGCAAAACGAGCATACAGAA	-147
pFM82139	ACGGCTAATCTCTTATCTTCCGCTGAGAAGAAGAGATTATCTATTTTCAC	-193
R100	IIIIII IIIII II III IIIIIII IIIIIIIII II III II ACGGCTAATCTCTTATCTGATCTCAGAGAAACAAAGATTATC-AGTGGCCC	-195
pFM82139	GAAAAAAGACGACGCATAAAGAGCTCAATGTTTTTCATACAAAACATACAT	-243
R100	II IIII II III III IIIIIII IIIIIIIII II III II GTAAAAAGACTTCTGTTCAAGCAAGTAAAAAGTATTTCTTGAACCAAAGTAT	-245
pFM82139	AAAGAAACTTCACACGAGCTTTCTGAAGAGACTGGAACCTACTCAGGCTCA	-293
R100	II III II III III IIIIIII IIIIIIIII IIIIIIIII II AAAGCAATCTTATGCAAAATCTCTCATGAAGATCTCTGACTCAGGCTGA	-295
pFM82139	AATGATTCAGCTTACTAATTCGAACCGGAAATCGCTAAAAAGAGCCTGAGATA	-343
R100	II III II III III IIIIIII IIIIIIIII IIIIIIIII II AATGATTCAGCTTACTAATAAAGTGAAGC-GCAAAAACGATGCATGTGA	-344
	Fin RepA2	
pFM82139	AGAAAGCTTAATCACTAACTTTCCTTGATCGTCTCGTCAGTGAGTCTTAGATT	-394
R100	III II III IIIIIII II III IIIIIIIIIII -TGATCGCTTACATTCCTTGAGTGTTCAGAAGATTAGTGCTTAGATT	-389
	-35 repA1 -10 repA1	
pFM82139	GCTGATCTGTAAAGAATTTTATAGCTTGGCCACGCCGTAAGGTGGCAGG	-444
R100	IIIIIIII III IIIIIIIII IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII II ACTGATCTGTAAAGAATTTTG-TGGCTGGCCACGCCGTAAGGTGGCAAG	-438
	->Inicio mRNA repA1	
	SmuI	
pFM82139	GAACTGATTCCTATGAGCTCTTACCCGGGACGAGAAAGCAAAAACCCC	-494
R100	IIIIIIIIIIIIIIII III III IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII GAACTGATTCCTATGAGCTGA-TTAC-AGGACTCAGAAAGCAAAAACCCC	-486
	Fin RNA-I<-	
pFM82139	GATAATCTTCTTATTTCTTAGGCAAGGAAA-GATTAACGGGCCCTACT	-543
R100	IIIIIIIIIIII IIIIIII IIIIIII IIIIIII IIIIIII III GATAATCTTCTTAACTTTAGGCAAGTACGAAAAGATTACCGGGGCCCACT	-536
	inc	
pFM82139	TAAACTGTATAGCCACCAATCAAGCTATTCAGGGAGTATAGTTTATGCT	-593
R100	IIIIII IIIIIIIII IIIIIII IIIIIII IIIIIIIIIIIII IIIII TAAACTGTATAGCCCAACAAATTCAGCTATTCAGGGAGTATAGTTATATGCC	-586
	Inicio RNA-I<- S/D -10 RNA-I Inicio lap lap	
pFM82139	CAGAAAATTTCAATACTTCTTTCTCTTCTTCATTTACTCCTTCCGTGCATTCG	-643
R100	II IIIII IIIII IIIII IIIIIIIII II IIIII IIIIIII CGGAAAATTTCAAGACTTCTTTCTCTCTTCG-C--TCGCTCCTTCTGCGCATTCG	-633



pFM82139	GAATACGTCACGCGACGCTTTACCGGGCGGGCTTGATGCCATGAAGCGGGA	-1441
R100	GGAAATGCGCGAAAGCGCTTCACGCGCAATCGTGAGGCGGTAAAACGCGA	-1427
pFM82139	GCTTACGCGCGCTGAAAGAGCGCATGATGATGTCGCGGGGCAAAAACCT	-1491
R100	ACTTACGCGCGCTGAAAGAGCGCATGATTCGTGTCACGTAACCGTAATT	-1477
pFM82139	ATACGCGACTGACCATGCGCACCGTCCCCATATAACCCACCAGATTATGA	-1544
R100	ATACGCGACTGCGCA-----CAGCTTCCCCCTGAAAGTGACCTCCTCTGAA	-1523
Fin RepA1		
pFM82139	AAATGCGCGCTGACGCGCGAGGATTTTGTCACGTCGTGTCGCGGGCGCGCC	-1594
R100	TAATGCGCGCTGCGCGCGAGGCTTCGCGACGTCGTAAGCCCCGACAGCGCA	-1573
pFM82139	TCTTTTCTGCGCGGAACGCTCGCTTCTTCCTGCTAAA-ATATCTCTCATTC	-1643
R100	CAAAAAATGCGACTACATACAAAAACAACCTCATCATCCAGCTTCTGG	-1623
pFM82139	TCTTCTGCGAAATGCGCGAGAAATGTTCCCGCGCTGAGTCATTTCCGGTCGCA	-1693
R100	TCTATCTGCGCGCGCTTCTTTTCTGATACAAAACACGCTTCACAGACGGGG	-1673
pFM82139	ATATTCAC <b>TTACTCACA</b> GATA <b>AACTGCA</b> AGGGACCTTTCCATAAAGTTACA	-1743
R100	AATTTTCT <b>TTATCCACA</b> TT <b>AACTGCA</b> AGGGACTTCCCCATAAAGTTACA	-1723
Inicio DnaA ->oriR		
pFM82139	ACCGATATACTGACAAAGCGCTCAGCGGACCTGATTTCAAAGTGCGTGCTT	-1793
R100	ACCGTTCATGTCATAAAGCGCATCCGCCAGCGTTACAGGGTGCAATGTA	-1773
Rq111		
pFM82139	TCTTTTAAACCGCAGATCTGTACTTCTTTTAAATACATAATCTTTCTCTC	-1843
R100	TCTTTTAAACACCGTATTATATCTCTTTTAAACTACTTAAT--TACATTC	-1821
pFM82139	TTATAAATAAATAAAGCTGTTTCATCACCTGCCCTGTGGACAGGT	-1886
R100	ATTTAAAAAGAAAAGTTATTCAGCTGCTGCTGCTGTGGACAGAC	-1864
<-oriR		

Figura 3.31.- Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del replicón IncFII del plásmido R100 y del replicón RepB de pFM82139. El número de nucleótidos se señala a la derecha. Datos sobre R100: los posibles promotores (-35 y -10) aparecen subrayados; la caja DnaA se indica en negrita y con subrayado doble, el posible lugar de unión a ribosomas (SD) aparece en cursiva; los codones de iniciación y de terminación de los ORFs se marcan en negrita; las bases iniciales y terminales de los RNAs se indican en negrita, cursiva y con subrayado doble; el origen de replicación lo delimitan bases en negrita, cursiva y con subrayado sencillo (Womble *et al.*, 1985, Blomberg *et al.*, 1992). Sobre la secuencia de pFM82139 aparecen en negrita los puntos de corte de las distintas endonucleasas de restricción empleadas. Bases idénticas: 1288. Porcentaje de identidad: 69%.



También se determinó la secuencia de aminoácidos, a partir de la secuencia nucleotídica de *repB*, de las proteínas RepAS y RepBS homólogas a las proteínas RepA y RepB del replicón del plásmido pYVe439-80 y a las proteínas RepA1 y RepA2 del plásmido R100, que intervienen en la replicación y de cuyo papel ya se habló en el apartado de Introducción.

La identidad existente entre la secuencias aminoacídica de RepAS, deducida de la secuencia nucleotídica de *repB*, y las proteínas iniciadoras de la replicación RepA (pYVe439-80) y RepA1 (R100) fue del 85 y 75 % respectivamente, siendo de un 81% la identidad entre estas dos últimas (Figura 3.32).

RepAS	VTDIRTLFTH YRQVKNPNEFTTPREGKKTLPFCRKLMAKAEGFTSRFDF	49
RepA	VTDIQALFTHHYRQVKNPNEFTTPREGKKTLPFCRKLMAKAEGFTSRFDF	50
RepA1	VTDLHQTY YRQVKNPNEFTTPREGACTLKFCCKLMEKAVGFTSRFDF	47
	*** . . . ***** ** * * * *	
RepAS	SVHVAFVRSLSGKRHRMPPLRRRAIDALLQGLCFHYDPLANRVQRSITNL	99
RepA	SMHVAFARSLSLRHRMPPLRRRAIDALLQGMCFHYDPLANRIQRSITNL	100
RepA1	AIHVAAHARSGLRRRMPPVLRRAIDALLQGLCFHYDPLANRVQCSITTL	97
	. . *** . * . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
RepAS	AIECGLATESKSONLSITRATRALKFMALGLITYQTEYDPIGICNIPTD	149
RepA	AIECGLATESKSONLSITRATRALRFLSELGLITYQTEYDPIGICNIPTD	150
RepA1	AIECGLATESAAGKLSITRATRALIFLSELGLITYQTEYDPIIGCYIPTD	147
	***** . * . ***** * . ***** * * * * *	
RepAS	ITFTPALFSALDVSDVAVMAARCSRVEWENQQRKKQNLPLEMDELIKA	199
RepA	ITFTPALFSALDVSDVAVAAARRSRVEWENQQRKKQNLPLEMDELIKA	200
RepA1	ITFTSALFAALDVSEFAVAAARRSRVWENQQRKKQGLDTLGMDELIKA	197
	*** . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
RepAS	WRFVREFRFSYQSERKIHGLKRARARRDADRTRKDIETLVKQQLTREYAS	249
RepA	WRFVREFRFSYQTERKAHGLKRARARRDADRTRDIEAIVNRQLTREIAE	250
RepA1	WRFVREFRFSYQTEIKSRGIKRARARRDADRERQDIVTLVKRQLTREIAE	247
	***** . * * . * . ***** . * . * . * . * . * . * . *	
RepAS	GRFTGGLDAMKREIQRRVKERMMSRCKNYTRLTMA TVPIXP	291
RepA	GRFVGNLDAVKREKARRVKERMMSRNNYTRLATG----AT	288
RepA1	GRFTANREAVKREVERRVKERMILSRNRNYSRLATAS----P	285
	*** . . . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	

Figura 3.32.- Comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de la secuencia *repA* del replicón del plásmido pYVe439-80, de la secuencia *repA1* del replicón del plásmido R100 y de la secuencia homóloga del plásmido pFM82139 (RepAS). Los asteriscos (\*) señalan residuos aminoacídicos idénticos (69.9%) y los puntos (.) identidad parcial (16%) entre las distintas secuencias. Se señalan en negrita los aminoácidos que se repiten en al menos dos de las secuencias.

La identidad existente entre la secuencia aminoacídica de RepBS y la de RepB fue del 69%, superior al 52% existente entre esta última y RepA2 (R100) y entre RepB y RepA2 (Figura 3.33).

RepBS	MSQIENAVTSSS	KRIYRKGNPLSSAEKKRLSISRKKITHKELNVFIQN	48
RepB	MSQIENAVTSSS	KRAYRKGNPLTCAEKQRMSVSRKKETHKAINVFIQN	48
RepA2	MSQIENAVTSSS	AKRAYRKGNPLSDAEKQRLSVARKRASFKVKVFLEP	50
	***.*****	** *****.****.*****.*****	
RepBS	IIKIESLUQLCEETGTTQAQMIELLIEREMAKR----	A	81
RepB	IIKIELLQLCEIDNGLTQTEMIERWIQREKAARTNAA		84
RepA2	KYKANLMQMCHIEGLTQAEVLTALIKSEAQKRC----	M	84
	*.*****	**.....**.*.*	

Figura 3.33.- Comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de la secuencia *repB* del replicón del plásmido pYVe439-80, de la secuencia *repA2* del replicón del plásmido R100 y de la secuencia homóloga del replicón del plásmido pFM82139 (RepBS). Los asteriscos (\*) señalan identidad entre los aminoácidos (46.5%) y los puntos (.) identidad parcial (32.6%). Se indican en negrita los aminoácidos que se repiten en al menos dos de las secuencias

Finalmente se realizó la traducción a proteína del tercer marco de lectura que aparece en la secuencia de estos replicones y que corresponde a la proteína Tap, implicada en el proceso de acoplamiento traduccional directo (Blomberg *et al.*, 1992) que ya se comentó en la Introducción. Se observó un 72% de identidad de la proteína Tap de pFM82139 con la de pYVe439-80 y un 52 % con la de R100. La identidad entre las proteínas Tap de pYVe439-80 y de R100 fue del 54% (Figura 3.34)

pFM82139	MLRKIQYLFLWHLLLP	CIVSAGRSD	25
pYVe439-80	MLRKVQYL	LRLLLLPCNLSAGRCD	24
R100	MPCKVQIDFFLC	SLLLR-IVSAGWCD	24
	* * * . *	***.****.*	

Figura 3.34.- Comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de los marcos abiertos de lectura *tap* de los plásmidos pFM82139, pYVe439-80 y R100. Los aminoácidos idénticos (44%) se señalan con un asterisco (\*), indicando los puntos (.) zonas de identidad parcial entre las distintas secuencias (20%). En negrita aparecen los aminoácidos que se repiten en al menos dos de las secuencias.

### 3.5.1.2.2.- Secuenciación de RepC

De forma análoga, la débil homología del replicón *repC* de *S. typhimurium* con el plásmido F, de tipo IncFI, demostrada en ensayos de hibridación por Tinge y Curtiss (1990a) llevó a determinar hasta qué punto era homóloga la secuencia nucleotídica del replicón RepC de *S. enteritidis* con la de las regiones implicadas en la replicación del plásmido F. De la misma forma se procedió al análisis de la secuencia nucleotídica de los distintos subclones que abarcaban dicho replicón. Se emplearon los iniciadores comerciales *Universal Primer* y *Reversal Primer* salvo en la secuenciación de la parte final del replicón en la que no fue posible obtener fragmentos discretos de DNA susceptibles de ser clonados en el vector pBluescript SK y ser secuenciados con dichos cebadores comerciales, por lo que se hizo uso de un oligonucleótido diseñado a partir de la zona secuenciada del replicón cercana al extremo 3' (Figura 3.29).

La secuencia obtenida se analizó empleando el programa FASTA en los bancos de datos internacionales del E.M.B.L. y reveló una elevada homología, del 72.6%, con la secuencia del replicón del grupo de incompatibilidad IncFI RepFIB, que fue aislado por primera vez del plásmido F, y cuya secuencia ha sido caracterizada tanto en el plásmido enterotoxigénico P307 por Saul *et al.* (1989) como en el plásmido colicinogénico pColV-K30 por Pérez-Casal y Crosa (1989). Del mismo modo que en *repB* y en base a la gran homología existente entre la secuencia de *repC* y la del replicón RepFIB, se localizó en la misma la secuencia codificante de la proteína implicada en el inicio de la replicación, RepA, la zona en que actúa dicha proteína así como las diversas regiones implicadas en la regulación de la actividad de la misma (Figura 3.35). Como se puede observar, aparece cierta disminución de homología en la zona final del replicón, zona que como se explicó en el capítulo de la introducción, estaba implicada en uno de los mecanismos de control de número de copias atribuidos a los replicones de esta clase.

Por otra parte se localizó dentro de la secuencia de *repC*, entre las bases 156 y 221, una secuencia de 66 pb idéntica a la descrita en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* y que, como se explicó en el apartado de introducción, parece implicada en la resistencia al suero (Vandenbosch *et al.*, 1989a). Dicha secuencia, denominada *rock*, se localizó dentro de la región promotora de *repC*. En ella se encuentran tres repeticiones asimétricas directas de 10 pb, dos de ellas idénticas mientras que la tercera conserva 8 de las 10 bases. Como también observaron Vandenbosch *et al.* (1989a) en el plásmido de *S. typhimurium*, se localizó una cuarta repetición de 10 pb, fuera de la secuencia de 66 pb, con también 8, de las 10 bases, conservadas.

pFM82139	TTATGAAAAACTATACGAATCACCTTGTCGGTCAGCAGGTTATCCACAT	-50
pColV-K30	GGAATGATTTATCCACAT	-18
	Sitio DnaA	
pFM82139	ATACAGTACTGATCCAGTAATAAGATCCTTACAACGATCCCTGTTAGA	-100
pColV-K30	ATCCGGAGGCTCGATCCAGTAAACAGATCCATG-AATGATCAACAAAGGA	-67
pFM82139	TCAAAAGAAGATCCCGACTCTTCTAAGGGCCGCGTCAGTACTGGGCCTGG	-150
pColV-K30	TCCATTAAAGATCCCTATATCGCTGCAAACCTTGTCACCTCATGGGCCGGG	-117
	Promotor potencial 1	
pFM82139	AGGATGATCAGCTAAACTCTTACCAATTTAATCATAAGCTGTAACTGGTAA	-200
pColV-K30	ACCAGGATCACATAAGCTCTTGGCATGTTACTGATAAACTGTAAACATGCTA	-167
	<div>&lt; B =&gt; &gt;&lt; C =&gt;</div> <div>10 ori -35 ori</div>	
	Promotor potencial 2	
pFM82139	ACAAATAAGCTGTATTATGCAAAAGGATAACTGTAAATGAGTTAGTAATATA	-250
pColV-K30	ATGATAAAGCTGTATTACCTAAATCCATATACTGAAGTAAGTTAATGACATA	-217
	<div>&gt;&lt; D =&gt; &gt;&lt; D' =&gt; &gt; &lt;</div>	
	Promotor potencial 3	
pFM82139	AACTACAGTGAATATGTTCCCTCGAAACTTCTTCAGGGCTGTGTATAAAGC	-300
pColV-K30	AACTATGTTCAATATGTCAGACTCA-----GTGTGTTAAATACA	-255
	<div>D' =&gt; &gt;</div> <div>05 repA -10 repA</div>	
pFM82139	TGAAGTACTGCTTACCACTTTTCAGGCTATAAACATGAAAACAGTGGCT	-350
pColV-K30	GCTGTCAGCTTTTCTTCACTCACTTACCGGAGTTCTGACACACGATTTT	-305
	Promotor potencial 4	
pFM82139	GCTTTTATTTCTTAAACTATTCACCGATCGGAGGCGCTCTGGACAAGGACA	-400
pColV-K30	CTGTTTATTTCTTTTACTTTTCACAGGCTGGAGGCTTCTTGGAACGAAA	-355
	S/D repA Inicio RepA	
pFM82139	ATCTGGACATAAAAAAGTTTCTTGAAGAGGTGGATAAATCCTCCGGTGAA	-450
pColV-K30	ATTTCAGACATCAAAAAACTGTTCTGGCGAGGTGGATAAGTCTCCGGTGAG	-405
pFM82139	ATCGTAAATCTTCACTCTTAATTCAGTAATACCGTGCAGCCTGTAGCTCT	-500
pColV-K30	CTGCTGACACTTCACTCTTAATTCAGTAATACCGTGCAGCCTGTGGCGCT	-455



	<i>Hae</i> III	
pFM82139	GGCCCAAGTTAAAGCCACCTCATGATGAGAGTGGCGGAGAAGCCCGCAACTG	-1299
pColV-K30	GTCCCGGTTTAAAGCGCCGAATGACCGAGAGTAAGGAAAAATCCGTTGCAA	-1252
pFM82139	CCAGCCACACCGGCTGACGTCAGTCCGGAGATGGCTGAAAAACTTGCCT	-1349
pColV-K30	CGTTACCTGGGGAAGATCAGTCCGGAGATGGCGGAGAAGCTTGCCCT	-1302
pFM82139	TCTTGATAAACTTGGCATCACACTTGTATGACCTGGAGAACTCTTCAAAT	-1399
pColV-K30	GGTTTACAAAATGGCATCAGCTGGATGACCTGGAAAAACTCTTCAAAT	-1352
pFM82139	CCCCGTGAACATAATCTCTAGTGAGTTATCCACTACTGTTTACTTATTAC	-1449
pColV-K30	CCCCGTGAACATAAACTCTTAGTCAGTGAAGAGCGCTCCTTTACTGACTAC	-1402
	Fin RepA< E => > < => F	
pFM82139	AGCTTATATTACTGCTCTCTGTGAGTGTCTCTGCTCACTACAGCTTATATA	-1499
pColV-K30	AGCTTATATTAAAGCTCTCACTGAGTGTCTCTGCTCACTGCAGTTTATATT	-1452
	> < => G >	
pFM82139	AGTACCTATGACAGCTACCTCATACCGGAAGCATATCCCTGATCCACAAAC	-1549
pColV-K30	CTATTTCTTGACCTACCTCTCTGTACCTGAGCTGCCATCTGCCCTGTCCCTT	-1502
pFM82139	TTTTACGAATCTCATCTCTTACTGACAGGAGCCCTGTGAACCCGTCGTT	-1599
pColV-K30	AGTTAACTCTCTCTCTCTTACTGACAGGAGCCCTGTGAACCCGTCGTT	-1538
pFM82139	CTGCTCTCATCTATCTTAATATCTTCACTACAGCTTATGTTGCCTGCTGC	-1649
pColV-K30	CTGCTCTTATATAAACATGACTTACTTCACTACAGCTTATAT-ACATGCTCC	-1587
	< => H < > => I	
pFM82139	AGTTTATTTAACTCACTACAGCTTATCTCTGGGAAGATTTACTCACCACA	-1699
pColV-K30	AGTTTATTTTAACTCACTACAGCTTATCTCTGGGAAGATTTACTCACCACA	-1618
	< => J	
pFM82139	CTTTTATATAAG	-1710
pColV-K30	CTTTTATATAAG	-1629

**Figura 3.35.-** Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del replicón RepFIB del plásmido pColV-K30 con el replicón RepC de pFM82139. El número de nucleótidos aparece a la derecha. Datos sobre pColV-K30: los posibles promotores (-35 y -10) aparecen subrayados; la caja DnaA se señala en doble subrayado y en negrita; el posible lugar de unión a ribosomas (SD) aparece en cursiva; los codones de iniciación y de terminación de los ORFs se marcan en negrita; las repeticiones directas, en las que se incluye la secuencia GATC reconocida por la *dam* metilasa, aparecen marcadas en negrita y cursiva (Pérez-Casal y Crosa, 1989). Se incluyen las repeticiones de 21 pb directas e invertidas, descritas en el replicón del plásmido p307, designadas de la B a la J y delimitadas por los signos > y <, indicándose el sentido de la repetición con una flecha; también se señala mediante flechas ↔ la presencia de otros posibles promotores potenciales descritos en p307 (Saul *et al.*, 1989). Sobre la secuencia de pFM82139 aparecen en negrita los puntos de corte de las endonucleasas de restricción empleadas. Entre las bases 156 y 221 de pFM82139 aparece subrayada la secuencia homóloga a *rsk*, estando subrayadas en línea continua las cuatro repeticiones de 10 pares de bases (ver detalles en el texto) (Vandenbosch *et al.*, 1989a). Bases idénticas: 1182. Porcentaje de homología: 72.6%.



copias. Por lo tanto, se muestra sólo el dato comparativo, adjudicando 1 al plásmido de menor número.

En este ensayo se utilizaron las construcciones pRepBK, pRepCK y pRepBK', esta última con una delección en el replicón RepB que afecta a la proteína RepA2 (RepB) (ver figuras 3.28 y 3.30). Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

Plásmido	Experimento 1		Experimento 2	
	$\beta$ -galactosidasa <sup>1</sup>	Número de copias	$\beta$ -galactosidasa <sup>1</sup>	Número de copias
pRepBK	55	2,6	57	1,4
pRepBK'	50	2,4	50	1,2
pRepCK	21	1,0	40	1,0

<sup>1</sup>Media de dos determinaciones.

Tabla 3.2.- Estimación del número de copias por citometría de flujo.

3.5.1.4.- Estudio de la estabilidad de los replicones RepB y RepC.

Como ya se comentó en el apartado de la Introducción, los plásmidos de virulencia de *Salmonella* poseen una serie de genes que en conjunto determinan la estabilidad de los mismos. Se consideró que sería interesante valorar la estabilidad de la que *per se* disfrutaban estos replicones sin la participación de los otros elementos implicados en el mantenimiento plásmidico.

Se sometió tanto a la construcción pRepBK como a la construcción pRepCK a un ensayo de estabilidad tal como se detalla en el capítulo de Materiales y Métodos. Las réplicas (100 para cada ensayo) se hicieron en placas de LB agar y de LB agar con una concentración de kanamicina de 50 µg/ml a las 48 y 72 horas de incubación en ausencia de antibióticos. Se consideró que las colonias capaces de crecer en presencia del antibiótico mantenían el plásmido, extrayéndose, no obstante, el DNA de algunas de ellas para confirmarlo.

El resultado expresado en % de la población que mantiene el plásmido se indica en la Tabla 3.3.

	pRepBK	pRepCK
48 h	62	20
72 h	60	16

Tabla 3.3.- Estabilidad de los replicones RepB y RepC



### 3.5.2.- Estudio de la región de partición de pFM82139.

Dentro de estas merece especial mención la región denominada en *S. typhimurium* como *parVP* (Cerin y Hackett, 1993), zona que determina el adecuado reparto de las copias del plásmido a las células hijas y que también es responsable del fenómeno de incompatibilidad plasmídica). Esta región, como ya se detalló en la introducción de este trabajo, engloba dos genes, *parA* y *parB*, y dos regiones determinantes de Incompatibilidad, *incR* y *parS* (o *incL*), que flanquean a dichos genes. En base a la homología existente entre la zona del plásmido de *S. typhimurium* donde ciertos autores (Tinge y Curtiss, 1990a) sitúan esta región *parVP* y la correspondiente zona del plásmido de *S. enteritidis*, parecía lógico pensar que dicha región *parVP* se encontraría en la mencionada zona de pFM82139, habida cuenta además de su importancia para el mantenimiento plasmídico. Se planteó pues, el objetivo de la clonación de la región *parVP* de *S. enteritidis*.

#### 3.5.2.1.- Clonación de la región de partición de *S. enteritidis*.

En el mapa del plásmido de *S. typhimurium* esta región comprende una zona equivalente en nuestro plásmido a parte de los insertos *HindIII* de los clones pMJ001 y pMJ005. Para clonarla se ligó el fragmento *Sall-HindIII* de 3.9 kb de pMJ001 al vector de clonación pBluescript KS cortado con las mismas enzimas. Posteriormente se introdujo en el punto *HindIII* del *polylinker* de la construcción anterior el fragmento *HindIII* de 2.7 kb correspondiente a pMJ005. Puesto que este fragmento se introdujo en las dos orientaciones posibles se eligió la que se adecuaba a la orientación relativa del inserto *HindIII* de 2.7 kb en pFM82139. Se obtuvo así la región *parVP* de *S. enteritidis* clonada en pBluescript KS (Figura 3.37).

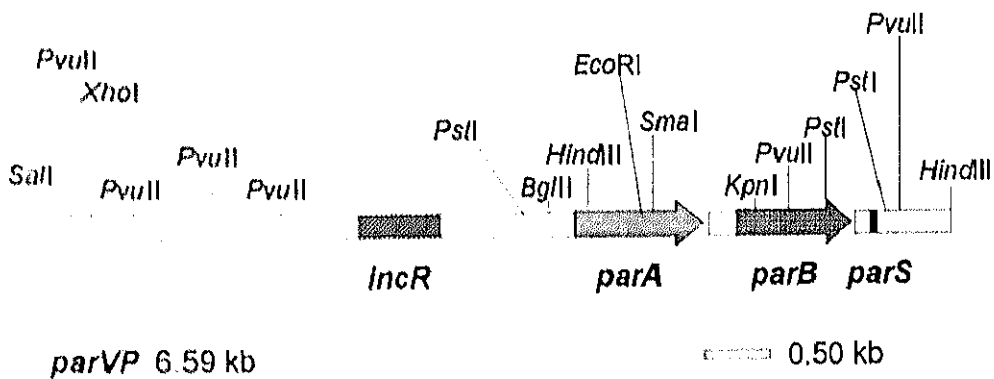


Figura 3.37.- Mapa de restricción de la región *parVP* del plásmido pFM82139

Con el fin de ver si había diferencias en el mapa de restricción de esta zona con respecto al ya publicado para *S. typhimurium*, tanto por Tinge y Curtiss (1990a) como por Cerin y Hackett (1993), y si estas posibles diferencias podían indicar alguna alteración en la funcionalidad de los genes y secuencias de incompatibilidad incluidas en esta región, se realizó un estudio de los puntos de corte de distintas enzimas. Se digirió esta construcción con *EcoRV*, *SmaI*, *HindIII*, *EcoRI*, *KpnI*, *PvuII*, *PstI*, *BamHI*, *SalI*, *XbaI*, *XhoI* y *BglII* efectuándose un cartografiado de la misma más completo del que se disponía con anterioridad (Figura 3.37). Se compararon los perfiles restricciónales de ambas zonas observándose que eran muy similares. Esto permitió tomar como referencia los puntos de corte de las diferentes enzimas para así situar los genes y regiones de incompatibilidad de la región *parVP* de *S. typhimurium* en la zona homóloga del plásmido de *S. enteritidis*. Se observó que las únicas diferencias con respecto al perfil restriccional de la misma región en el plásmido de *S. typhimurium* eran la desaparición del punto de corte *HindIII* (que ya habíamos detectado con anterioridad durante el estudio del clon pMJ005) de la zona del gen *parA* más próxima a *parB*, debida a la sustitución de una guanina por una timina que no afectaba al aminoácido codificado, alanina, y la desaparición del punto de corte *EcoRV* (también detectada con anterioridad) situado en el gen *parB* debido a un cambio de una adenina por una guanina lo cual suponía la sustitución del aminoácido isoleucina por valina, ambos neutros e hidrofóbicos.

### 3.5.2.2.- Influencia de la región *parVP* en la estabilidad de los replicones RepB y RepC.

Dada la precaria estabilidad que presentaban los replicones del plásmido de virulencia de *S. enteritidis*, principalmente RepC, en comparación con la que presentaba el plásmido completo, pareció interesante estudiar la influencia que ejercería en la estabilización de los mismos una de las regiones implicada en el mantenimiento del mismo, la región *parVP*.

Como ya se comentó anteriormente, se han descrito dentro de la región *parVP* del plásmido de *S. typhimurium* dos mecanismos de partición relacionados. En uno de ellos estarían implicados los genes *parA*, *parB* y la región *parS* y en el otro el gen *parA* y la región *IncR*. Para estudiar la influencia de ambos sistemas en la estabilización de los replicones era necesario clonar por separado las regiones de la zona *parVP* responsables de cada uno de dichos mecanismos de partición. Además dichas regiones debían clonarse en posición *cis* con respecto a *repB* y *repC*, ya que esta es la forma, como se explicó en la Introducción, en que dicha región *parVP* actúa. Para la clonación por separado de las regiones de la zona *parVP* implicadas en ambos mecanismos de partición nos basamos en el mapa de restricción de la construcción *parVP* de que disponíamos (Figura 3.37) y en los datos publicados por Tinge y Curtiss (1990a) y Cerin y Hackett (1993).

#### 3.5.2.2.1.- Clonación de la zona *parA/IncR* en *cls* con respecto a *repB*.

Se digirió la construcción constituida por la región *parVP* de pFM82139 clonada en pBluescript KS (Figura 3.37) con la enzima de restricción *PvuII* y se electroeluyó el fragmento mayor de 3.75 kb que contenía la región *incR* y el gen *parA* íntegros, así como un resto de *parB* que supusimos no funcional. La construcción pRepBK2 (Figura 3.28) se sometió a digestión con *HpaI*, electroeluyéndose, previa desfosfatización, el fragmento de 6.8 kb que englobaba el replicón RepB el gen de la kanamicina y parte del gen *lacZ*. Puesto que la ligación de ambos fragmentos de extremos romos ocasionó la pérdida del punto de corte de las dos enzimas, la comprobación de la corrección de las dos construcciones obtenidas pARRepBK12 y pARRepBK23, correspondientes a las dos posibles orientaciones en las que había entrado el inserto *PvuII*, se hizo estudiando los puntos de corte de otras enzimas presentes en dichos fragmentos (Figura 3.38).

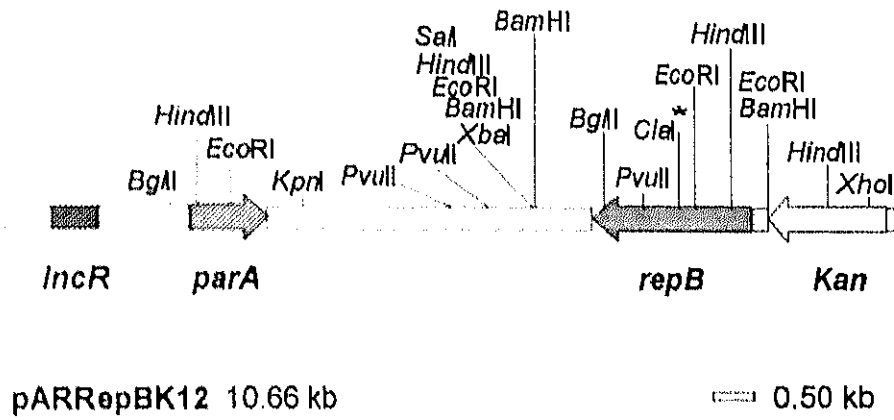
#### 3.5.2.2.2.- Clonación de la zona *parA/parB/parS* en *cls* con respecto a *repB*.

Esta construcción se realizó en dos fases. En la primera se incubó la construcción que contenía *parVP* (Figura 3.37) con las endonucleasas de restricción *XbaI* y *BglII*, se electroeluyó el fragmento de 3.05 kb que contenía *parA*, *parB* y *parS* y se ligó al vector de clonación pBluzK digerido con *XbaI* y *BamHI* dando lugar a una construcción que fue denominada pBluzKABS. La unión de los extremos producidos por *BamHI* y por *BglII* provocó la pérdida del punto de corte para ambas enzimas, por lo que la verificación de esta construcción se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior. Posteriormente pBluzKABS se digirió con las enzimas *XbaI* y *XhoI* con el fin de separar el origen de replicación de tipo ColE1 presente en el vector de clonación pBluzK del fragmento de 8.5 kb, que fue electroeluido. Dicho fragmento, que poseía además de *parA/parB/parS*, el gen de resistencia a kanamicina y el gen *lacZ*, se ligó al fragmento electroeluido de 4 kb *XbaI-XhoI* de pRepBK2 (Figura 3.28) que contenía el replicón RepB. La construcción resultante recibió la denominación pABSRepBK (Figura 3.39).

#### 3.5.2.2.3.- Clonación de la zona *parA/IncR* en *cls* con respecto a *repC*.

Se desfosfatizó y electroeluyó el fragmento *PvuII* de 7.3 kb de pRepCK (Figura 3.28) que contenía el replicón RepC y el gen de resistencia a kanamicina y se ligó al producto de la electroelución del fragmento *PvuII* de 3.75 kb de la construcción *parVP* que englobaba *parA* e *incR*. La construcción resultante fue denominada pARRepCK y contenía el inserto *PvuII* de 3.75 kb en una orientación determinada (Figura 3.40).

A



B

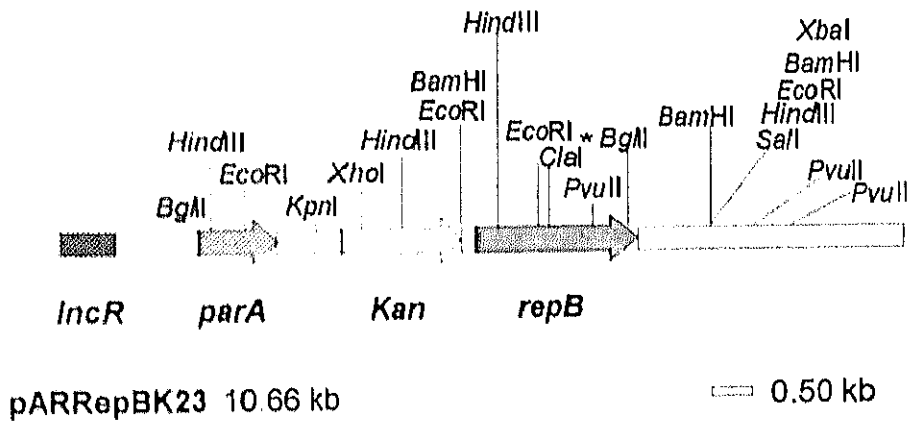


Figura 3.38.- Mapa de restricción de las construcciones (A) pARRepBK12 y (B) pARRepBK23. (\*) *ClaI* sólo caracterizada en ese punto.

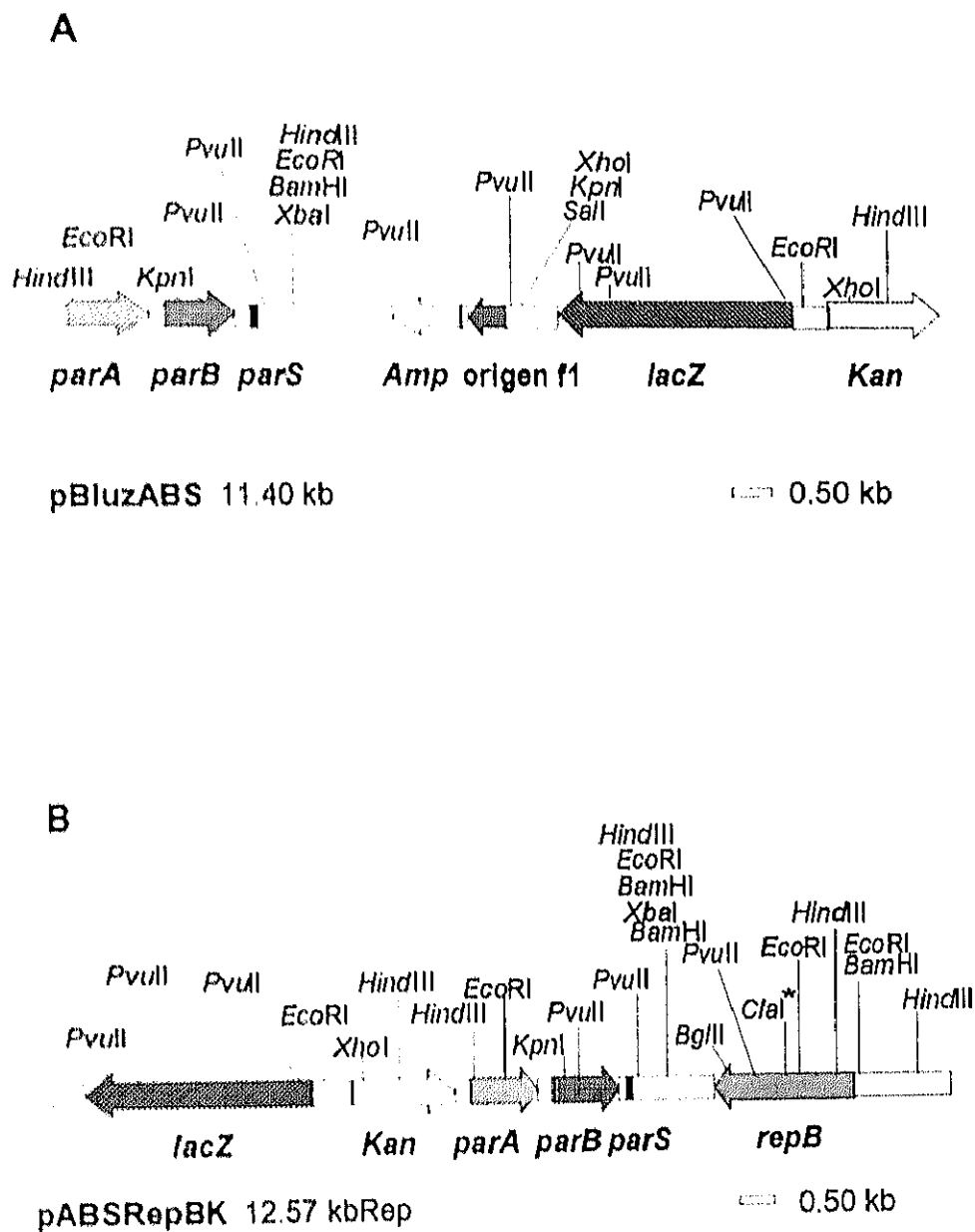


Figura 3.39.- Mapa de restricción de las construcciones (A) pBluzABS y (B) pABSRepBK.(\*) *ClaI* sólo está caracterizada en ese punto.

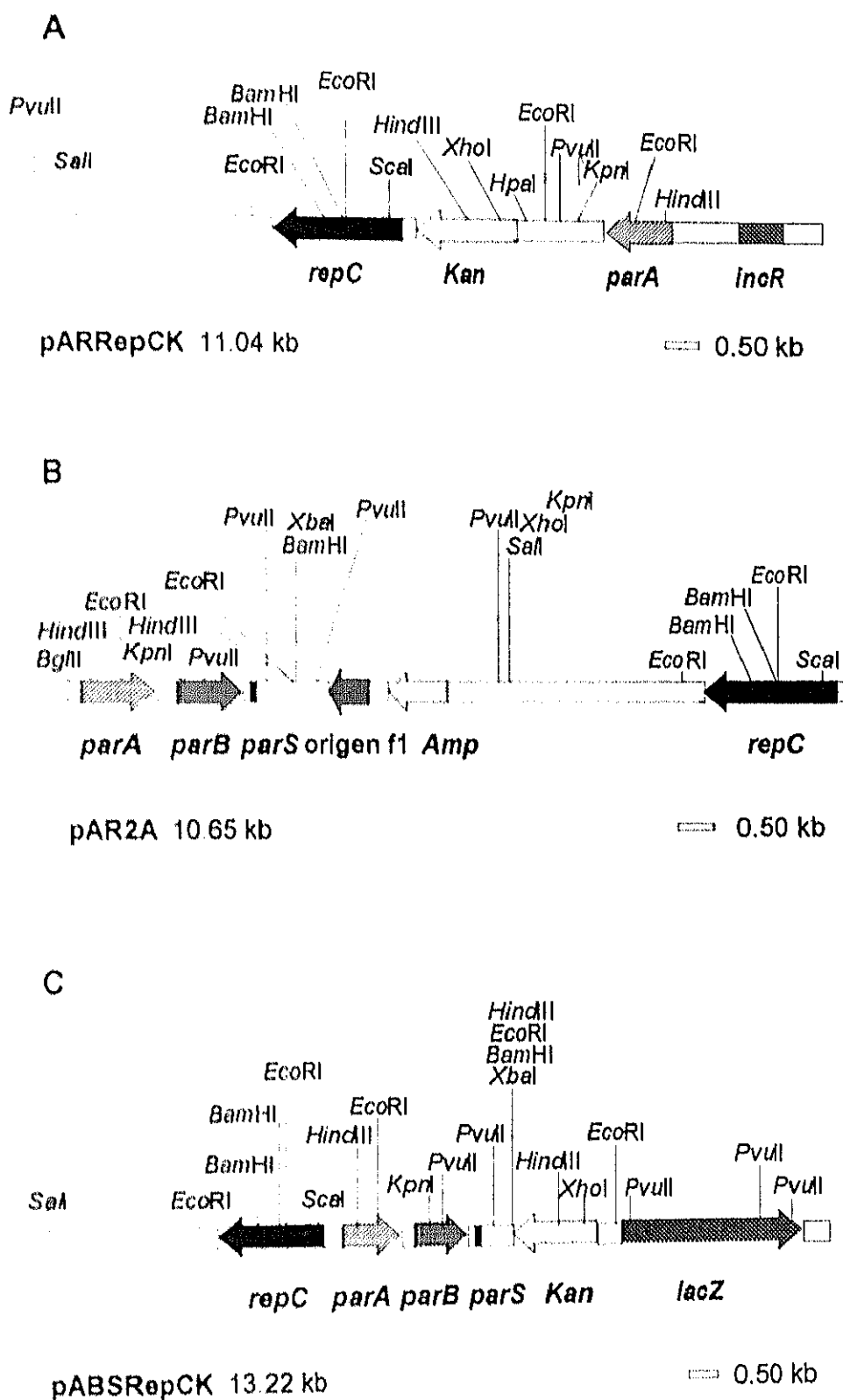


Figura 3.40.- Mapa de restricción de las construcciones  
(A) pARRepCK, (B) pAR2A y (C) pABSRRepCK.

### 3.5.2.2.4.- Clonación de la zona *parA/parB/parS* en *cls* con respecto a *repC*

En una primera etapa se electroeluyó el fragmento *BglII-SalI* de 4.7 kb de pFMRepC que contenía *repC* y se ligó al fragmento electroeluido *BglII-SalI* de 6 kb de la construcción que constituida por *parVP* (Figura 3.37) que contenía *parA*, *parB* y *parS* para originar el clon pAR2A (Figura 3.40). Mediante la digestión de dicho clon con las endonucleasas *XbaI* y *SalI* se eliminó del mismo el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación tipo ColE1. El fragmento de 7.7 kb resultante que albergaba *parA/parB/parS* y *repC*, se electroeluyó y se unió al fragmento electroeluido *XbaI-SalI* de 5.5 kb de pBluzK (ver Materiales), que confería resistencia a kanamicina. La construcción resultante se denominó pABSRepCK (Figura 3.40).

### 3.5.3.- Estudio de la Incompatibilidad de las regiones de replicación *repB* y *repC*.

La incompatibilidad define el parentesco existente entre los replicones de los plásmidos. Sin embargo, en el caso de los plásmidos de virulencia de *Salmonella*, se ha descrito que la incompatibilidad la marca la región *parVP* y no los replicones (Cerin y Hackett, 1989). Como los datos de secuencia de los replicones RepB y RepC mostró la presencia de regiones equivalentes a

Plásmido entrante	Plásmido residente	Tras selección del plásmido entrante <sup>1</sup>	A las 25 generaciones sin selección <sup>2</sup>
pFMRepC (ColE1)	pRepBK	93% ambos 7% pFMRepC	77% pRepBK 23% sin plásmidos
	pRepCK	100% pFMRepC	"
pRepCK	pFMRepB (ColE1)	70% ambos	50% sin plásmidos 35% pRepCK 15% pFMRepB
	pFMRepC (ColE1)	100% pRepCK	
pFMRepB (ColE1)	pRepBK	80% ambos 20% pFMRepB	96% pRepBK 2% sin plásmidos 2% pFMRepB
	pRepCK	58% ambos 42% pRepCK	80% sin plásmidos 20% pFMRepB
pRepBK	pFMRepB (ColE1)	24% ambos	82% pRepBK 12% pFMRepB 6% sin plásmidos
	pFMRepC (ColE1)	93% ambos	64% ambos 17% pFMRepC 12% sin plásmidos 7% pRepBK

Tabla 3.3.- Incompatibilidad entre los replicones RepB y RepC del plásmido de *S. enteritidis*.

<sup>1</sup>Medido a partir de una colonia conteniendo ambos plásmidos.

<sup>2</sup>La presencia de uno de los plásmidos se indica en esta columna sólo cuando fue posible detectarlo por producción de  $\beta$ -galactosidasa.

las implicadas en incompatibilidad de otros plásmidos, se decidió hacer ensayos de incompatibilidad entre ellos. Se utilizó en cada caso uno de los replicones clonados en pBluescript y el otro como miniplásmido, llevando el primero como marcador resistencia a ampicilina y el otro resistencia a kanamicina, realizando el ensayo como se indica en el apartado de Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 3.3

Puesto que la escasa estabilidad de los miniplásmidos constituidos por los replicones RepB y RepC (ver apartado 3.5.1.4) podía influir en los resultados obtenidos, se procedió a realizar un nuevo ensayo empleando en su lugar las construcciones pARRepBK<sup>n</sup> (concretamente pARRepBK23) y pABSRepCK descritas en el apartado 3.5.2.2. Estas construcciones, además de contener dichos replicones, estaban estabilizadas por la presencia de las dos regiones de la zona *parVP*. Los resultados de este ensayo se resumen en la Tabla 3.4.

Plásmido entrante	Plásmido residente	Tras selección del plásmido entrante <sup>1</sup>	A las 25 generaciones sin selección <sup>2</sup>
pFMRepC (ColE1)	pARRepBK ( <i>par</i> )	100% ambos	100% ambos
	pABSRepCK ( <i>par</i> )	100% pFMRepC	
pABSRepCK ( <i>par</i> )	pFMrepB (ColE1)	81% pABSRepCK 19% ambos	75% pABSRepCK 21% ambos 3% sin plásmidos 1% pFMRepB
	pFMRepC (ColE1)	100% pABSRepCK	
pFMRepB (ColE1)	pARRepBK ( <i>par</i> )	82% ambos 18% pFMRepB	100% ambos
	pABSRepCK ( <i>par</i> )	100% ambos	53% pABSRepCK 36% ambos 7% pFMRepB 4% sin plásmidos
pARRepBK ( <i>par</i> )	pFMRepB (ColE1)	20% ambos 80% pARRepBK	93% pARRepBK 4% ambos 3% pFMRepB
	pFMRepC (ColE1)	100% ambos	78% ambos 21% pARRepBK 1% pFMRepC

Tabla 3.4.- Incompatibilidad entre los replicones RepB y RepC del plásmido de *S. enteritidis* estabilizados por la región *parAparBparS* o *parAincR*

<sup>1</sup>Medido a partir de una colonia conteniendo ambos plásmidos.

<sup>2</sup>La presencia de uno de los plásmidos se indica en esta columna sólo cuando fue posible detectarlo por producción de  $\beta$ -galactosidasa.



## 4.- DISCUSIÓN

#### 4.1. Comparación entre los plásmidos de virulencia de *S. enteritidis* y *S. typhimurium*.

Como se ha detallado en la Introducción, los plásmidos de virulencia de *Salmonella* presentan una región de aproximadamente 8 kb altamente conservada entre los distintos serovares, *spv*, responsable del efecto del plásmido en la dosis letal de la bacteria para animales. Esta región se ha analizado en los plásmidos de *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. dublin* y *S. choleraesuis*, pero se desconoce la función de sus productos. Dado que estos plásmidos oscilan entre 50 y 90 kb, según serovar, resta espacio para una gran cantidad de información adicional. En los últimos años se ha explorado con detalle el plásmido de *S. typhimurium* (Figura 4.1), y se ha comprobado la homología de algunas de sus regiones con los de los otros serovares citados. El plásmido de *S. dublin* es el que muestra menos homología, careciendo incluso de uno de los dos replicones, RepC, y asimilándose por ello a los plásmidos de los serovares específicos de animales, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* (Tinge y Curtiss, 1990b). Como se ha indicado en objetivos, el plásmido de *S. enteritidis* fue el escogido para nuestro estudio, por la mayor incidencia que tiene este serovar en España (Usera *et al.*, 1992), que se ha ido además

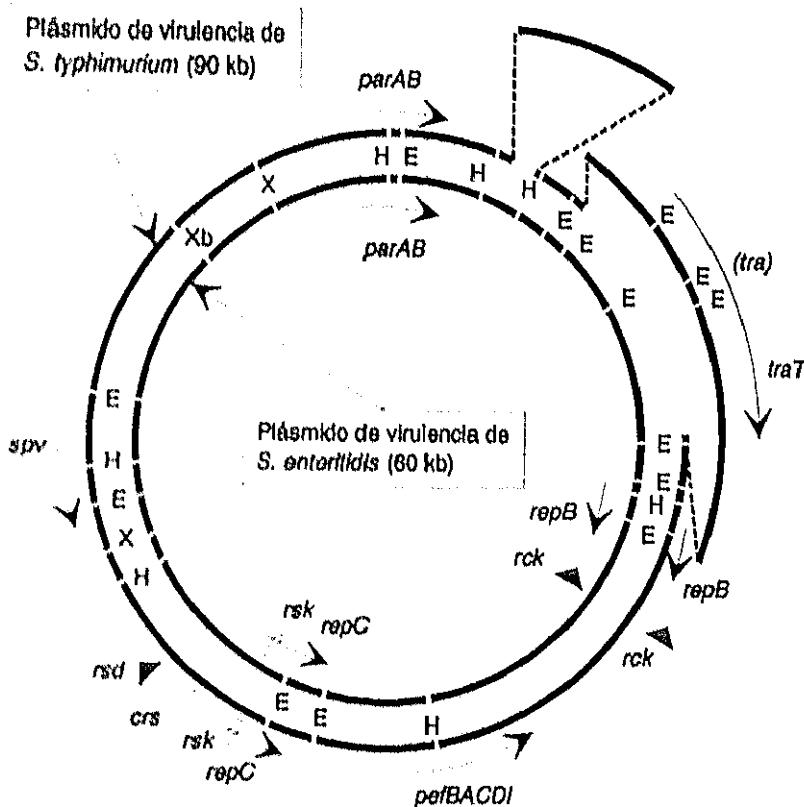


Figura 4.1.- Comparación de los mapas de restricción de los plásmidos de virulencia de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. Se indica la localización de las regiones *parAB*, *repB*, *repC* (Tinge y Curtiss, 1990a), *rsk* (Vandenbosch *et al.*, 1989a), *pef* (Friedrich *et al.*, 1993), *rsd/crs* (Krause y Guiney, 1991), *spv* (Gulig, 1990) y de los genes *rck* (Friedrich *et al.*, 1993) y *traT* (Rhen *et al.*, 1988). Puntos de corte de endonucleasas de restricción: E, *EcoRI*; H, *HindIII*; X, *XhoI* y Xb, *XbaI*.

incrementando en los últimos años en Estados Unidos y Reino Unido (Editorial1993). Dado que esta mayor incidencia no se aprecia en los aislamientos realizados a partir de animales o de alimentos, su papel predominante en las gastroenteritis debe atribuirse a su carácter patógeno, y por ello es conveniente el estudio de sus determinantes de virulencia.

La cepa *S. enteritidis* 82139 había sido aislada de una muestra de heces durante un brote de gastroenteritis. El tamaño del plásmido de virulencia obtenido de dicha cepa se evaluó en 60 kb, correspondiente a la suma de los fragmentos obtenidos por restricción, y es idéntico al descrito por Guiney *et al.* (1994) y ligeramente superior a las cifras publicadas anteriormente (Nakamura *et al.*, 1985, Helmuth *et al.*, 1985, Brown *et al.*, 1993). Como estos autores se basaron en la comparación con otros plásmidos, método poco exacto cuando se trata de plásmidos de elevado tamaño, lo más probable es que todos los plásmidos de *S. enteritidis* tengan idéntico tamaño.

En el presente trabajo se presenta un mapa detallado del plásmido de *S. enteritidis*, cuyo cartografiado no se había acometido hasta el momento. En este mapa se detallan 42 puntos de corte de 7 enzimas, lo cual hace mucho más fácil la identificación y la clonación de las diferentes partes del plásmido. Además se ha realizado un cartografiado más preciso (con 6 enzimas más) de regiones implicadas en el mantenimiento del plásmido como son las zonas *rep* y *par*. La enzima *Xba*I corta únicamente en un punto, al igual que en los plásmidos de los otros serovares, lo cual es lógico dado que en su secuencia de reconocimiento se encuentra el tetranucleótido CTAG el cual está presente en muy baja frecuencia en los genomas bacterianos (McClelland *et al.*, 1987).

Montenegro *et al.* (1991) llevaron a cabo un estudio comparativo entre los plásmidos de virulencia de los distintos serovares de *Salmonella* mediante el análisis mediante microscopía electrónica de los heterodúplex formados entre los mismos, y determinaron una homología del 99% entre los plásmidos de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. Estos autores apuntaron la posibilidad de que en esas regiones homólogas debían encontrarse los genes implicados en la replicación y partición de los mismos, puesto que además de pertenecer al mismo grupo de incompatibilidad eran extremadamente estables. El cartografiado del plásmido de *S. enteritidis* y su comparación con el de *S. typhimurium* publicado por Tinge y Curtiss (1990a), así como la identificación mediante ensayos de hibridación de los fragmentos *Hind*III homólogos de dichos plásmidos, no han permitido delimitar con bastante precisión, no sólo las variaciones en el patrón de restricción de los mismos, sino también las zonas del plásmido de *S. typhimurium* de las que carecía el plásmido objeto de nuestro estudio.

Se observó que los fragmentos *Hind*III del plásmido de *S. enteritidis* que hibridaban con fragmentos del mismo tamaño del plásmido de *S. typhimurium* correspondían a aquellos que englobaban los genes implicados en virulencia (*spv*) y replicación (*repC*). Por otro lado se observó que el fragmento *Hind*III de pFM82139 que hibridaba con el fragmento *Hind*III que, según el mapa del plásmido de *S. typhimurium*, contenía *repB*, hibridaba también con otro de menor tamaño que

sumado al anterior igualaba al de pFM82139, lo cual indicaba la desaparición de un punto de corte *HindIII* en el plásmido de *S. enteritidis*.

En cuanto a los fragmentos *HindIII* del plásmido de *S. typhimurium* que compartían la zona *par*, se pudo observar que, si bien el más grande tenía un tamaño idéntico a su homólogo de pFM82139, el menor hibridaba con un fragmento *HindIII* del plásmido de *S. enteritidis* 200 pb mayor. El estudio pormenorizado de los mapas de restricción de ambos plásmidos reveló la desaparición de un punto de corte *HindIII* en la región de pFM82139 que contenía la zona *par* y que explicaba esa diferencia de tamaños. Se confirmaba de esta manera la hipótesis postulada por Montenegro *et al.* (1991) acerca la conservación de las regiones del plásmido implicadas en el mantenimiento del mismo, a la vez que se situaban las regiones divergentes, ya que sus resultados informaban del número y extensión de tales regiones, pero no de su localización.

Dos de los fragmentos *HindIII* de pFM82139 respondían a las 30 kb de diferencia entre ambos plásmidos. En la zona correspondiente del plásmido de *S. typhimurium* se localiza la región *tra* de transferencia por conjugación, que no es funcional (Rhen *et al.*, 1988). El fragmento más pequeño, contiguo a la zona *par*, hibridó con uno del plásmido de *S. typhimurium* 8 kb mayor. La comparación de sus mapas de restricción señalaba que la zona común debía encontrarse en el extremo colindante con la región *par*. El fragmento mayor, correspondiente al clon pMJ002B, hibridaba con uno 22 kb mayor. Dada la gran diferencia de tamaño era difícil aseverar, mediante la comparación de los patrones de restricción, cuál era o eran las zonas más conservadas, si bien se podía destacar el mantenimiento de las posiciones de los puntos de corte de dos enzimas de restricción situadas en el extremo del fragmento que limita con el fragmento *HindIII* que contiene *repB* y de algunas posiciones *EcoRI* y *SalI* del centro de los fragmentos.

La búsqueda infructuosa del gen *traT*, perteneciente a los genes de transferencia además de mediar resistencia al suero, en el plásmido de *S. enteritidis*, nos confirmó que este plásmido debía proceder del plásmido de *S. typhimurium*, o de un ancestro común, a través de delecciones. En efecto, el resto de la región *tra* de *S. typhimurium* hibridó con la zona correspondiente de pFM82139. Es altamente improbable que el plásmido de *S. typhimurium* derive del de *S. enteritidis* por inserción del gen *traT*, para dar lugar a un operón aún incompleto, mientras que es muy fácil que se haya producido una delección que reduzca más el tamaño de la región *tra*, ya inútil.

Se observó también la ausencia del locus *vagC/vagD* en el plásmido de *S. enteritidis* y confirmó igualmente en el caso del plásmido de *S. typhimurium*. Estos datos concuerdan con el hecho ya apuntado por Montenegro *et al.* de que el plásmido de *S. dublin* es el que presenta menor homología con los del resto de los serovares.

La comparación de las zonas conservadas de los mapas de restricción de *S. typhimurium* (Tinge y Curtiss, 1990a) y *S. enteritidis* reveló algunas diferencias no sólo en cuanto a aparición y desaparición de puntos de corte para distintas endonucleasas de restricción sino también en cuanto a las distancias existentes entre las mismas. Si bien las primeras pueden achacarse, y de

hecho a ello se deben, a sustituciones de unos nucleótidos por otros, las últimas pueden ser adjudicables a los distintos criterios empleados en el cartografiado de estos plásmidos.

Como se comentó en la Introducción, no está del todo aclarado el papel que juega el plásmido de virulencia en la resistencia al suero. Existen varios genes de origen plasmídico implicados en mayor o menor medida, según los distintos autores, en este fenotipo, si bien existe unanimidad total en que van a ser los lipopolisacáridos de membrana los principales responsables del mismo.

El gen *rck* ha sido descrito por Heffernan *et al.* (1992) como implicado en la resistencia al suero de *S. typhimurium*. Estos mismos autores lo detectaron mediante hibridación DNA-DNA en los plásmidos de virulencia de *S. enteritidis* y *S. dublin*. En el presente trabajo se ha confirmado la presencia de dicho gen tanto en el plásmido de *S. enteritidis* como en el de *S. typhimurium*, y se ha localizado por hibridación y clonado. En oposición a los datos presentados por Heffernan *et al.*, no se observó resistencia alguna de la cepa de *E. coli* portadora de *rck* frente a concentraciones de suero humano normal del 50%, si bien crecía perfectamente con la misma cantidad de suero humano inactivado lo cual indicaba su falta de resistencia a la acción lítica del complemento. Se redujeron las cantidades de suero humano hasta un 10% y se observó una resistencia similar a la de la cepa control que contenía únicamente el vector de clonación pBluescript SK. Se barajó la posibilidad de que dicho gen solamente confiriera resistencia frente a la acción lítica del complemento activado por la vía alternativa, por lo que se eliminaron los posibles anticuerpos frente a *E. coli* que pudiera haber en el suero problema. Los resultados fueron similares.

Hay que concluir por tanto que el gen *rck*, si bien presente en el plásmido de virulencia de *S. enteritidis* no es funcional. Debe recordarse que algunos autores (Hovi *et al.*, 1988) descartan cualquier posible papel del plásmido de virulencia de *S. enteritidis* en la resistencia al suero: empleando concentraciones de suero de cobaya del 10%, con y sin anticuerpos, no detectaron diferencias en la resistencia al suero entre cepas de *S. enteritidis* con plásmido y carentes de él. A resultados similares llegaron Gullig y Curtiss (1987) en *S. typhimurium*. Estos resultados no implican necesariamente la falta de funcionalidad de *rck* en *E. coli*, sino que la resistencia al suero de *Salmonella* mediada por lipopolisacáridos puede enmascarar cualquier otra contribución. De ser así, no es raro que *rck* haya acabado perdiendo su funcionalidad a consecuencia de una mutación, puesto que no es necesario en *Salmonella*, al igual que ha ocurrido con *traT* en *S. enteritidis* con respecto a *S. typhimurium*.

Para aclarar finalmente este aspecto será conveniente tratar de expresar *rck* y detectar su producto de 17 kD.

En cuanto a la ausencia del gen *traT*, hay que añadir que este resultado contradice la opinión de Sukupolvi *et al.* (1990) que defendieron su existencia en el plásmido de *S. enteritidis*, pero apoya las observaciones arriba citadas de Hovi *et al.*

## 4.2. Replicación del plásmido de *S. enteritidis*.

Tinge y Curtiss (1990a) clonaron los dos replicones existentes en el plásmido de *S. typhimurium*, a los que denominaron *repB* y *repC*. Asimismo, detectaron por hibridación la presencia de ambos en los plásmidos de virulencia de *S. enteritidis* y *S. choleraesuis*, existiendo únicamente *repB* en el de *S. dublin*.

Utilizamos los datos publicados por estos autores para localizar los replicones homólogos en el plásmido de *S. enteritidis*.

### 4.2.1. Características del replicón RepB.

La estabilidad observada para el miniplásmido pRepBK construido a partir de este replicón (del orden del 60 %) resultó ser notablemente inferior a la notificada por Tinge y Curtiss (1990a) (95.8% al cabo de un número similar de generaciones). La construcción de estos autores constaba únicamente de un fragmento de DNA plasmídico unas 200 pb superior a pBKm y de un marcador de selección de resistencia a kanamicina. Esta diferencia de estabilidad no podía achacarse a la carencia de algún fragmento de *repB*, puesto que la secuenciación del mismo confirmó la presencia de todos los elementos que constituirían los replicones de esta clase. La presencia de alguna secuencia anexa a *repB* que estuviera presente en la construcción de Tinge y Curtiss y que aumentara su estabilidad era también improbable puesto que la zona en que el fragmento clonado por estos autores supera en 200 pb al clonado en pBKm corresponde a genes implicados en la síntesis de fimbrias (Friedrich *et al.*, 1993). La única posibilidad es que el gen *lacZ* en sí o el aumento de tamaño provocado por el mismo, de aproximadamente 3 kb, sean las responsables de este descenso en su estabilidad. No obstante resulta algo sorprendente la estabilidad tan elevada descrita por estos autores para un replicón con tan bajo número de copias (2-3 por cromosoma según los mismos autores), habida cuenta de que al carecer de un sistema de partición el reparto de las copias se realiza por segregación al azar. Si se aplica la fórmula que predice la herencia de un plásmido que únicamente utiliza para su reparto la segregación al azar (Williams y Thomas, 1992)  $P_0 = 2^{1-n}$  (en la que  $P_0$  es la probabilidad de que aparezca una célula sin plásmido tras la división celular y  $n$  es el número de copias del plásmido por célula en el momento de la división) se obtiene en este caso un de 50 a un 75% de estabilidad, que coincide con nuestras observaciones.

Tinge y Curtiss (1990a) habían descrito la existencia de una débil hibridación del replicón funcional RepB con plásmidos del grupo IncFII de incompatibilidad, concretamente R100, pero no observaron incompatibilidad con plásmidos de este grupo. Al secuenciar el replicón análogo del plásmido de *S. enteritidis* comprobamos que efectivamente presentaba homología con el replicón RepFIIA del plásmido R100, pero mayor aún con el del plásmido de virulencia pYVe439-80 de *Yersinia enterocolitica*, también del grupo de incompatibilidad IncFII (Vanooteghem y Cornelis,

1990). Por lo tanto, los plásmidos de virulencia de estas dos enterobacterias presentan un parentesco mayor en su replicón que con plásmidos de resistencia, como R100.

La organización genética es la misma: *repB* del plásmido de virulencia de *S. enteritidis* contiene dos marcos abiertos de lectura correspondientes a las proteínas RepA y RepB de pYVe439-80 y a las RepA1 y RepA2 de R100. Las secuencias de aminoácidos están aún más conservadas. La proteína RepA de *S. enteritidis* (que hemos denominado RepAS) presenta un 85% de aminoácidos idénticos a la correspondiente de *Y. enterocolitica*, siendo de un 81% la identidad con RepA1 de R100. La proteína represora de *S. enteritidis* (RepBS) mostró un 69% de identidad con la homóloga de *Y. enterocolitica*, y un 52% con RepA2 de R100. Las identidades entre las proteínas del plásmido de *Y. enterocolitica* y de R100 son del 75% y 52% respectivamente. Por lo tanto, los plásmidos de virulencia de *S. enteritidis* y *Y. enterocolitica* se muestran más próximos entre sí que de un plásmido de resistencia a antibióticos como es R100. Hay que hacer notar que la proteína Rck del plásmido de *S. typhimurium* es también homóloga a una proteína de *Y. enterocolitica*. All, en este caso de codificación cromosómica, y que se ha observado también homología entre genes cromosómicos implicados en la invasión de células por estas dos bacterias [Galan1992]. En general, los estudios moleculares muestran cada vez más parentesco entre estas dos enterobacterias patógenas.

Un tercer marco de lectura, el correspondiente al péptido Tap, también fue detectado en la secuencia de *repB*. Como se ha comentado en la Introducción, la secuencia de aminoácidos del péptido Tap varía sustancialmente entre los distintos replicones IncFII, pero se mantiene su tamaño de 24 aminoácidos y las posiciones relativas de su RBS con respecto al sitio de unión del RNA-I (CopA) y de su triplete de terminación con el RBS y triplete de iniciación de *repA*. Se cree que esta disposición permite el acoplamiento traduccional que conduce a la síntesis de RepA cuando el RNA-I no bloquea la traducción de *tap* (Blomberg *et al.*, 1992). La secuencia de *tap* en el plásmido de *S. enteritidis* muestra de nuevo un mayor parentesco con la del plásmido pYVe439-80 de *Y. enterocolitica* que con la de R100, pero la divergencia en el contenido de aminoácidos es grande, y contiene uno más (25). Sin embargo, las posiciones entre los RBS y los tripletes de iniciación y terminación arriba citados se mantienen inalteradas, lo que apoya el mecanismo propuesto de acoplamiento traduccional.

Por otra parte, la secuencia que da lugar al RNA-I de *repB* consta de 91 bases al igual que el resto de los RNA-I de este grupo de incompatibilidad, encontrándose perfectamente conservada la secuencia de 6 nucleótidos responsable de la interacción RNA-RNA y que en la secuencia aparece señalada con las siglas *inc*. Esto parece indicar que el plásmido de *S. enteritidis* debería ser incompatible con R100, en contra de lo descrito por Tinge y Curtiss (1990a) para el plásmido de *S. typhimurium*. No obstante, hay que señalar que tal incompatibilidad no afectaría al plásmido de *Salmonella*, que posee un segundo replicón, y que la incompatibilidad expresada por el replicón

RepB de nuestro plásmido es bastante débil (ver más adelante); por tanto, es posible que dependiendo de las condiciones del experimento tal incompatibilidad no se manifieste.

El número de copias relativo de pRepBK se estimó en 1.4 a 2.6 veces las de pRepCK. Este dato coincide con la valoración de Tinge y Curtiss (1990a), que la estimaron entre 2 y 10 copias según la construcción empleada, frente a 2-3 copias de RepC. En el proceso de construcción del miniplásmido portador del replicón RepB se obtuvo también el plásmido pBRepBK' que carecía de las 200 primeros pares de bases del replicón (Figura 3.28), lo que significaba la ausencia de la región promotora de *repA2* (o *repB*) y del comienzo de la zona codificante de la proteína. Sin embargo, el cálculo de su número de copias arrojó una cifra ligeramente inferior a la del replicón completo presente en pRepBK, en clara contradicción con los datos aportados por la bibliografía (Scott, 1984), según los cuales mutaciones en este gen provocan un aumento del número de copias. La proteína RepBS de *S. enteritidis* presenta tres aminoácidos menos que las homólogas de pYVe439-80 y R100; serán necesarios más datos para aclarar si esta diferencia puede afectar a su función y hacer que el control del número de copias dependa únicamente del RNA antisentido RNA-I en el plásmido de *Salmonella*.

#### 4.2.2. Características del replicón RepC.

La clonación de *repC* se realizó también por comparación con el mapa de Tinge y Curtiss. En su mapa *repC* aparecía situado aproximadamente entre dos puntos de corte *Bgl*II en un fragmento *Hind*III equivalente al clonado en pMJ002A. La desaparición de uno de esos puntos de corte *Bgl*II en el plásmido de *S. enteritidis* obligó a elegir un fragmento *Bgl*II-*Sal*I mayor para su clonación. Dicho fragmento unido a un marcador de selección y al gen *lacZ* era capaz de replicarse. Sin embargo la estabilidad de dicha construcción, denominada pRepCK, al igual que en el caso anterior era mucho menor que la notificada por Tinge y Curtiss para la suya constituida por el fragmento *Bgl*II y por un marcador de resistencia a antibióticos idéntico al de pRepCK. Estos autores daban una cifra de estabilidad del 66.9 % al cabo de 60 generaciones mientras que en el estudio realizado en este trabajo la cifra descendía a un 20 % al cabo de un periodo similar, y 24 horas más tarde era ya de un 16 %. En este caso la construcción que contenía el replicón RepC de *S. enteritidis* era mucho mayor que la de Tinge y Curtiss, alcanzando las 10 kb frente a las 4.6 de la construcción de esos autores. Quizá sea esa diferencia de tamaño la que haga aún más inestable dicha construcción, aunque no parece que esa sea la razón de una diferencia tan grande de estabilidad. El DNA extra anejo a RepC presente en pRepCK está implicado, al menos en el plásmido de *S. typhimurium*, en la síntesis de fimbrias lo cual no debería influir en la estabilidad de dicha construcción. Tinge y Curtiss observaron una débil hibridación del replicón RepC del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* con el plásmido F del grupo IncFI. Dado que F presenta tres replicones presentes en dicho plásmido (uno de ellos no funcional), este dato proporciona



poca información sobre la naturaleza del replicón del plásmido de *S. enteritidis*. Los datos de secuencia obtenidos nos han permitido adscribir claramente RepC al grupo IncFI, dentro del cual presenta mayor parentesco con el del plásmido colicinogénico y de virulencia pColV-K30 y el del plásmido enterotoxigénico p307, y una homología menor con el replicón RepFIB del plásmido F, todos ellos plásmidos aislados de *E. coli*. Estos replicones hacen gala de una gran inestabilidad cuando constituyen miniplásmidos (Lane y Gardner, 1979), lo cual está de acuerdo con nuestras observaciones.

La secuencia de aminoácidos deducida para la proteína RepA (a la que se denominó RepAS') mostró una elevada homología con la de pColV-K30 (que es a su vez idéntica a la de p307). Sin embargo, el promotor adjudicado por Spiers y Bergquist (1992) a la proteína RepA no puede ser funcional en el plásmido de *S. enteritidis* puesto que entre las secuencias -35 y -10 aparece en él una inserción que altera la distancia entre ambas. Teniendo en cuenta que existen otras cuatro regiones promotoras potenciales, y que la elección de la citada se hizo sólo en base a su mayor eficiencia en la expresión de fusiones *lacZ*, es perfectamente posible que el plásmido de *S. enteritidis* utilice otro promotor alternativo, independientemente de cuál sea en verdad utilizado por p307 y pColV-K30.

En el resto de la secuencia de RepAS' se aprecia cierta variación en la posición de la secuencia repetida J con respecto a las demás, en comparación con las observadas en el plásmido p307. Este cambio no tendría ninguna incidencia en la unión de RepAS' según el modelo de interacciones intermoleculares, y es muy dudoso que la secuencia J pueda intervenir en la formación de bucles intramoleculares, puesto que se halla como supernumeraria respecto a las secuencias *upstream*.

#### 4.3. Función de la región *parVP*.

Las regiones de partición son de vital importancia en el mantenimiento de plásmidos de bajo número de copias, como son los de los serovares no tifoideos de *Salmonella*. Son además responsables de los fenómenos de incompatibilidad plasmídica. El estudio detallado de su mapa de restricción reveló la falta de dos puntos de corte con respecto a los mapas de esta misma región realizados por Tinge y Curtiss (1990a) y Cerin y Hackett (1993), uno para la enzima *HindIII*, situada dentro de la región codificante de ParA y otro para *EcoRV* situado dentro del gen *parB*. El análisis mediante secuenciación de las zonas que debían contener dichos puntos de corte reveló la sustitución de una base por otra como causa de su desaparición. Se observaron también distintas sustituciones de unas bases por otras, pero nunca deleciones o inserciones. Además las sustituciones se producían en el tercer nucleótido de cada triplete, no cambiando el aminoácido o haciéndolo por otro de similares características, según se dedujo de su comparación con la secuencia de las proteínas ParA y ParB publicada por Cerin y Hackett (1993). Esto señalaba el

elevado grado de conservación de esta zona, reflejo de la importante función desempeñada por la misma.

Se ha descrito que los *loci parA*, *parB* y *parS* del plásmido de *S. typhimurium* son necesarios, sin la participación de *incR*, para estabilizar un plásmido derivado del vector de clonación pACYC184 (Tinge y Curtiss, 1990a); por otro lado, la presencia de *incR* permite la estabilización del plásmido de virulencia de *S. typhimurium*, o de un plásmido derivado del vector pBR322, sólo con el concurso de *parA* (Cerin y Hackett, 1989). Por lo tanto, el plásmido de virulencia de *Salmonella* contiene dos sistemas de partición dentro su región *parVP* (Cerin y Hackett, 1993) (Véase el apartado 1.3.3.1).

Sin embargo, no se ha investigado la actuación independiente de los dos sistemas de partición sobre el plásmido de *Salmonella* completo o sobre sus dos replicones.

La inestabilidad observada para los miniplásmidos pRepBK y pRepCK es aún mayor que la detectada por Tinge y Curtiss (1990a), pero mantiene la misma proporcionalidad, en el sentido de que RepC es mucho más inestable que RepB.

El uso de las combinaciones *parAincR* y *parAparBparS* mostró una función preferencial con respecto a los dos replicones: mientras que la primera estabilizaba a RepB sin afectar significativamente a RepC, la segunda estabilizaba muy eficazmente a RepC mientras producía el efecto contrario sobre RepB. Si, como se ha sugerido, la región *parVP* actúa suministrando una secuencia con funciones de centrómero (*incR* o *parS*) y una proteína (ParA) que interacciona con ella y con la maquinaria de división celular, es difícil comprender su preferencia por un tipo u otro de replicón. Michiels *et al.* (1987) habían observado una disminución en el número de copias del plásmido de *Salmonella* al provocar una delección en la región *parVP*, y Cerin y Hackett (1989) sugirieron que esta región podía actuar también como un control remoto del número de copias. Aunque estas opiniones no han sido mantenidas, podría indicar la existencia de algún tipo de interacción entre los replicones y *parVP*, que explicaría el efecto diferencial observado por nosotros. Por lo tanto, es necesario un estudio más detallado de este fenómeno.

#### 4.3.1. Incompatibilidad y partición.

Los ensayos de incompatibilidad se iniciaron utilizando uno de los replicones, RepB o RepC, clonados en un vector multicopia para detectar su efecto en *trans* sobre un miniplásmido formado por cada uno de estos replicones unido a un gen de resistencia.

Los resultados indican que RepC exhibe incompatibilidad fuerte consigo mismo, independientemente de que se seleccione la entrada del miniplásmido (pRepCK) o del clon en pBluescript (pFMRepC). Resulta sorprendente que este último pueda ser desplazado por el miniplásmido pRepCK, puesto que cabría esperar que utilizase el replicón de pBluescript (tipo

ColE1) para mantenerse. De hecho, el análisis en gel de electroforesis muestra que pFMRepC está presente en multicopia, y que por lo tanto utiliza realmente el replicón ColE1.

En el caso de RepB, la incompatibilidad aparece de forma más débil, y a las 25 generaciones sin presión selectiva acaba predominando el miniplásmido pRepBK sobre el clon pFMRepB, independientemente del plásmido seleccionado en la entrada.

Al considerar conjuntamente los datos sobre estabilidad de los replicones e incompatibilidad, se puso de manifiesto que la inestabilidad de los miniplásmidos contruídos, especialmente de pRepCK, podía falsear algunos experimentos. Esto resultó bastante aparente al ensayar la incompatibilidad entre RepB y RepC. Los datos indican una cierta incompatibilidad, que no cabría esperar por su distinta naturaleza, y que es mucho más aparente cuando no se selecciona pRepCK, un plásmido muy inestable.

Para evitar este problema se repitieron los ensayos de incompatibilidad utilizando las contrucciones que incorporaban las regiones *par* en los miniplásmidos, siempre en la combinación más estable.

Utilizando estas construcciones se confirma la fuerte incompatibilidad entre los replicones RepC, independientemente de la selección.

Por el contrario, pFMRepB se muestra incapaz de desplazar eficientemente al miniplásmido pARRepBK, mientras que este último desplaza en un 80% al primero. Parece, por tanto, que es mucho más eficaz el sistema de partición en el mantenimiento del plásmido de bajo número de copias, que el reparto al azar del plásmido multicopia que utiliza el replicón ColE1.

Una vez resuelta la estabilidad de RepC por la presencia de la región *par*, este replicón se muestra totalmente refractario a ser desplazado por RepB, contradiciendo los resultados obtenidos con pRecCK. En este experimento es pFMRepB el que se pierde en mayor medida, lo que parece atribuible de nuevo a que la falta de un sistema de partición tiene más importancia que su número de copias más elevado.

## CONCLUSIONES

1. La obtención de un detallado mapa de restricción de un plásmido de virulencia representativo de *Salmonella enteritidis* ha permitido comparar su organización con el plásmido de virulencia de *Salmonella typhimurium* y servir de base para su estudio genético.
2. La comparación entre los mapas de restricción y los resultados de hibridación entre los distintos fragmentos de ambos plásmidos, indican que difieren básicamente en dos regiones suplementarias que posee el plásmido de *S. typhimurium*.
3. La ausencia en el plásmido de *S. enteritidis* de parte de la región *tra* (concretamente *traT*) existente en el plásmido de *S. typhimurium*, indica, junto con los datos anteriores, que el primer plásmido procede del segundo, o de un ancestro común, a través de deleciones.
4. El gen *rck*, que media resistencia al suero en el plásmido de *S. typhimurium*, está también presente en el de *S. enteritidis*, pero no proporciona resistencia a *Escherichia coli* al ser clonado en un vector multicopia.
5. El replicón RepB del plásmido de *S. enteritidis* pertenece, según su secuencia y organización genética, al grupo IncFII de replicones, presentando gran homología con el del plásmido de virulencia de *Yersinia enterocolitica*.
6. El replicón RepC del plásmido de *S. enteritidis* pertenece, según su secuencia y organización genética, al grupo IncFI de replicones, presentando gran homología con la de los plásmidos de virulencia pColV-K30 y p307 de *E. coli*.
7. Dada la homología detectada, las conclusiones 5 y 6 pueden extenderse a los correspondientes replicones del plásmido de *S. typhimurium*, al margen de pequeñas variaciones que puedan existir en su secuencia, que no es aún conocida.
8. La región de partición *parVP* del plásmido de *S. enteritidis* se muestra muy conservada con respecto a la de *S. typhimurium*. La actividad de las dos regiones funcionales, *parAparBparS* y *parAincR*, muestra efectos distintos sobre la estabilidad de los dos replicones, revelando una especificidad no descrita anteriormente.
9. Se ha detectado la expresión de incompatibilidad por parte de cada uno de los replicones aislados, que es independiente de la expresada por la región *parVP*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abe A, Matsui H, Danbara H, Tanaka K, Takahashi H, Kawahara K. 1994. Regulation of *spvR* gene expression of *Salmonella* virulence plasmid pKDSC50 in *Salmonella choleraesuis* serovar *Choleraesuis*. *Mol. Microbiol* 12: 779-87.
- Abeles AL, Austin SJ. 1991. Antiparallel plasmid-plasmid pairing may control P1 plasmid replication. *P.N.A.S.USA* 88: 9011-5.
- Alvarez, A.M., Ibáñez, M., Rotger, R. 1993. A simple method to measure activity in bacteria by flow cytometry. *BioTechniques* 15: 974-6.
- Argos P, Landy A, Abremsky K, Egan JB, Haggard-Ljungquist E, Hoess RH, Kahn ML, Kallionis B, Narayana SVL, Pierson III LS, et al. 1986. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J* 5: 433-40.
- Austin S, Abeles A. 1983a. Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. II. The partition region of miniplasmid P1 encodes an essential protein and a centromere-like site at which it acts. *J Mol. Biol* 169: 373-87.
- Austin S, Abeles A. 1983b. Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. I. P1 and F miniplasmids contain discrete, interchangeable sequences sufficient to promote equipartition. *J Mol. Biol* 169: 353-72.
- Austin S, Ziese M, Sternberg N. 1981. A novel role for site specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25: 729-36.
- Austin SJ. 1988. Plasmid partition. *Plasmid* 20: 1-19.
- Barrow PA, Lovell MA. 1988. The association between a large molecular mass plasmid and virulence in a strain of *Salmonella pullorum*. *J Gen Microbiol* 134: 2307-16.
- Barrow PA, Simpson JM, Lovell MA, Binns MM. 1987. Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect Immun* 55 (2): 388-92.
- Bergquist PL, Lane HED, Malcolm L, Downward RA. 1982. Molecular homology and incompatibility in the IncFI plasmid group. *J. Gen. Microbiol.* 128: 223-38.
- Bergquist PL, Saadi S, Maas WK. 1986. Distribution of basic replicons having homology with RepFIA, RepFIB, and RepFIC among IncF group plasmids. *Plasmid* 15: 19-34.
- Birboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23.
- Blomberg P, Nordström K, Wagner EGH. 1992. Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *EMBO J.* 11: 2675-83.
- Brown DJ, Threlfall EJ, Hampton MD, Rowe B. 1993. Molecular characterization of plasmids in *Salmonella enteritidis* phage types. *Epidemiol. Infect.* 110: 209-16.
- Caldwell AL, Gulig PA. 1991. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid encodes a positive regulator of a plasmid-encoded virulence gene. *J. Bacteriol.* 173: 7176-85.
- Catty, D., Raykundalia, C. 1988. Production and quality control of polyclonal antibodies. En: Catty, D. (Ed.) *Antibodies Vol.1 a practical approach*. Oxford Washington DC: IRL Press, p. 19-79.
- Cerin H. 1993. The *parVP* region of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid pSLT contains four loci required for incompatibility and partition. *Plasmid* 30: 30-8.
- Cerin H, Hackett J. 1989. Molecular cloning and analysis of the incompatibility and partition functions of the virulence plasmid of *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* 7: 85-99.
- Chattoraj D, Cordes K, Abeles A. 1984. Plasmid P1 replication: negative control by repeated DNA sequences. *P.N.A.S.USA* 81: 6456-60.
- Chikami GK, Flierer J, Guiney DG. 1985. Plasmid-Mediated Virulence in *Salmonella dublin* Demonstrated by Use of a Tn5-*oriT* Construct. *Infect. Immun.* 50(2): 420-4.
- Coynault C, Robbe-Saule V, Popoff MY, Norel F. 1992. Growth phase and *SpvR* regulation of transcription of *Salmonella typhimurium spvABC* virulence genes. *Microb. Pathog.* 13: 133-43.
- Davey MJ, Funnell BE. 1994. The P1 plasmid partition protein ParA. *The journal of biological chemistry* 269: 29908-13.
- Davis MA, Austin SJ. 1988. Recognition of the P1 plasmid centromere analog involves binding of the ParB protein and is modified by a specific host factor. *EMBO J.* 7: 1881-8.
- Davis MA, Martin K, Austin S. 1991. Biochemical activities of the P1 partition proteins. *Plasmid* 25: 247-8.
- Davis MA, Martin KA, Austin SJ. 1992. Biochemical activities of the ParA partition protein of the P1 plasmid. *Mol. Microbiol.* 6: 1141-7.

- Dong X, Womble DD, Luckow VA, Rownd RH. 1985. Regulation of transcription of the *repA1* gene in the replication control region of IncFII plasmid NR1 by gene dosage of the *repA2* transcription repressor protein. *J.Bacteriol.* **161**: 544-51.
- Editorial. 1993. *Salmonella*: A chicken-and-egg phenomenon. *ASM News* **59**: 386-7.
- Emoto M, Danbara H, Yoshikai Y. 1992. Induction of gamma/delta T cells in murine salmonellosis by an avirulent but not by a virulent strain of *Salmonella choleraesuis*. *J.Exp.Med.* **176**: 363-72.
- Fang FC, Krause M, Roudier C, Fierer J, Guiney DG. 1991. Growth regulation of a *Salmonella* plasmid gene essential for virulence. *J.Bacteriol.* **173**: 6783-9.
- Fang FC, Libby SJ, Buchmeier NA, Loewen PC, Switala J, Harwood J, Guiney DG. 1992. The alternative sigma factor *katF* (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**: 11978-82.
- Fierer J, Eckmann L, Fang F, Pfeifer C, Finlay BB, Guiney D. 1993. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in cultured macrophages and nonphagocytic cells. *Infect.Immun.* **61**: 5231-6.
- Fierer J, Krause M, Tauxe R, Guiney D. 1992. *Salmonella typhimurium* bacteremia: association with the virulence plasmid. *J.Infect.Dis.* **166**: 639-42.
- Filutowicz, M., McEachern, M., Greener, A., et al. 1985. Role of the  $\pi$  initiation protein and direct nucleotide sequence repeats in the regulation of plasmid R6K replication. En: Helinski, D.R., Cohen, S.N., Clewell, D.B., Jackson, D.A., Hollander, H. (Eds.) *Plasmids in bacteria*. New York: Plenum Press, p. 125-40.
- Friedman SA, Austin SJ. 1988. The P1 plasmid-partition system synthesizes two essential proteins from an autoregulated operon. *Plasmid* **19**: 103-12.
- Friedrich MJ, Kinsey NE, Vila J, Kadner RJ. 1993. Nucleotide sequence of a 13.9 kb segment of the 90 kb virulence plasmid of *Salmonella typhimurium*: the presence of fimbrial biosynthetic genes. *Mol.Microbiol* **8**: 543-58.
- Funnell BE. 1991. The P1 plasmid partition complex at *parS*. *J.Biol.Chem.* **266**: 14328-37.
- Gammie AE, Crosa JH. 1991. Roles of DNA adenine methylation in controlling replication of the REPI replicon of plasmid pColV-K30. *Mol.Microbiol.* **5**: 495-503.
- Gardner R, McNulty J, Feher E, Lane D. 1985. Location of *rep* and *inc* sequences in the F secondary replicon. *Plasmid* **13**: 145-8.
- Gerdes K, Larsen JEL, Molin S. 1985. Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *J.Bacteriol.* **161**: 292-8.
- Gerdes K, Molin S. 1986. Partitioning of plasmid R1. Structural and functional analysis of the *parA* locus. *J.Mol.Biol.* **190**: 269-79.
- Gibbs MD, Spiers AJ, Bergquist PL. 1993. RepFIB: a basic replicon of large plasmids. *Plasmid* **29**: 165-79.
- Grindley NDF, Reed R. 1985. Transpositional recombination in prokaryotes. *Ann.Rev.Biochem.* **54**: 863-96.
- Guiney DG, Fang FC, Krause M, Libby S. 1994. Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol.Lett.*
- Gulig PA. 1990. Virulence plasmids of *Salmonella typhimurium* and other salmonellae. *Microb.Pathog.* **8**: 3-11.
- Gulig PA, Caldwell AL, Chiodo VA. 1992. Identification, genetic analysis and DNA sequence of a 7.8-kb virulence region of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *Mol.Microbiol* **6**: 1395-411.
- Gulig PA, Curtiss III R. 1987. Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect.Immun.* **55**: 2891-901.
- Gulig PA, Curtiss III R. 1988. Cloning and Transposon Insertion Mutagenesis of Virulence Genes of the 100-Kilobase Plasmid of *Salmonella typhimurium*. *Infect.Immun.* **56** (12): 3262-71.
- Gulig PA, Danbara H, Guiney DG, Lax AJ, Norel F, Rhen M. 1993. Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol.Microbiol* **7**: 825-30.
- Hackett J, Kotlarski I, Mathan V, Francki K, Rowley D. 1986. The colonization of peyer's patches by a strain of *Salmonella typhimurium* cured of the cryptic plasmid. *J.Infect.Dis.* **153** (6): 1119-25.
- Hackett J, Wyk P. 1986. Molecular cloning of a gene encoding a 23-kDa outer membrane polypeptide from the cryptic plasmid of *Salmonella typhimurium*, *FEMS Microbiol.Lett.* **36**: 251-6.
- Hackett J, Wyk P, Reeves P, Mathan V. 1987. Mediation of serum resistance in *Salmonella typhimurium* by an 11 KD polypeptide encoded by the cryptic plasmid. *J.Infect.Dis.* **155** (3): 540-9.



- Hakkaart MJJ, Van Den Elzen DJM, Veltkamp E, Nijkamp HJJ. 1984. Maintenance of multicopy plasmid CloDF13 in *E. coli* cell: evidence for site specific recombination at *parB*. *Cell* 36: 203-9.
- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. En: Glover, D.M. (Ed.) DNA cloning. Oxford, England: IRL PRESS, p. 120
- Harrison JA, Pickard D, Higgins CF, Khan A, Chatfield SN, Ali T, Dorman CJ, Hormaeche CE, Dougan G. 1994. Role of *hns* in the virulence phenotype of pathogenic salmonellae. *Mol.Microbiol.* 13: 133-40.
- Hatfull, G.F., Grindley, N.D.F. 1989. Resolvases and DNA invertases: a family of enzymes active in site-specific recombination. En: Kucherlapati, R., Smith, G.R. (Eds.) Genetic recombination. Washington, D.C. American Society for Microbiology. p. 357-96.
- Heffernan EJ, Fierer J, Chikami G, Guiney D. 1987. Natural history of oral *Salmonella dublin* infection in BALB/c mice: effect of an 80-Kb-pairs plasmid on virulence. *J.Infect.Dis.* 155 (6): 1254-9.
- Heffernan EJ, Harwood J, Fierer J, Guiney D. 1992. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid complement resistance gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and *ail*. *J.Bacteriol.* 174: 84-91.
- Helmuth R, Stephan R, Bunge C, Hoog B, Steinbeck A, Bulling E. 1985. Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect.Immun.* 48 (1): 175-82.
- Higgins CF, Hinton JCD, Hulton CSJ, Owen-Hughes T, Pavitt GD, Seirafi A. 1990. Protein H1: A role for chromatin structure in the regulation of bacterial gene expression and virulence. *Mol.Microbiol.* 4: 2007-12.
- Hoertt EB, Ou J, Kopecko JD, Baron SL, Warrent LR. 1989. Novel virulence properties of the *Salmonella typhimurium* virulence-associated plasmid: immune suppression and stimulation of splenomegaly. *Plasmid* 21: 48-58.
- Hovi M, Sukupolvi S, Edwards AS, Rhen M. 1988. Plasmid-associated virulence of *Salmonella enteritidis*. *Microb.Pathog.* 4: 385-91.
- Jaffé A., Ogura T., Hiraga S. 1985. Effect of the *ccd* function of the F-plasmid on bacterial growth. *J.Bacteriol.* 163: 841-9.
- Jones GW, Rabert DK, Svinarich DM, Whitfield HJ. 1982. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella typhimurium* with autonomously 60-Megadalton plasmids. *Infect.Immun.* 38 (2): 476-86.
- Kado CI, Liu S-T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J.Bacteriol.* 145: 1365-73.
- Kawahara K, Hamaoka T, Suzuki S, Nakamura M, Murayama SY, Arai T, Terakado N, Danbara H. 1989. Lipopolysaccharide alteration mediated by the virulence plasmid of *Salmonella*. *Microb.Pathog.* 7: 195-202.
- Kawahara K, Haraguchi Y, Tsuchimoto M, Terakado N, Danbara H. 1988. Evidence of correlation between 50-kilobase plasmid of *Salmonella choleraesuis* and its virulence. *Microb.Pathog.* 4: 155-63.
- Kline BC. 1985. A review of mini-F plasmid maintenance. *Plasmid* 14: 1-16.
- Kolleck R, Oertel M, Goebel W. 1978. Isolation and characterization of the minimal fragment required for autonomous replication of a copy mutant (PNK102) of the antibiotic resistance factor R1. *Mol.Gen. Genet.* 162: 51-7.
- Kowarz L, Coynault C, Robbes-Saule V, Norel F. 1994. The *Salmonella typhimurium* *katF* (*rpoS*) gene: Cloning, nucleotide sequence, and regulation of *spvR* and *spvABC* virulence plasmid genes. *J.Bacteriol.* 176: 6852-60.
- Krause M, Fang FC, Guiney DG. 1992. Regulation of plasmid virulence gene expression in *Salmonella dublin* involves an unusual operon structure. *J.Bacteriol.* 174: 4482-9.
- Krause M, Fierer J, Guiney D. 1990. Homologous DNA sequences on the virulence plasmids of pathogenic *Yersinia* and *Salmonella dublin* Lane. *Mol.Microbiol.* 4: 905-11.
- Krause M, Guiney DG. 1991. Identification of a multimer resolution system involved in stabilization of the *Salmonella dublin* virulence plasmid pSDL2. *J.Bacteriol.* 173: 5754-62.
- Lane D, Feyter R, Kennedy M, Phua SH, Semon D. 1986. D protein of miniF plasmid acts as repressor of transcription and as a site-specific resolvase. *Nucleic Acids Res.* 14: 9713-28.
- Lane D, Gardner RC. 1979. Second *EcoRI* fragment of F capable of self-replication. *J.Bacteriol.* 139: 141-51.
- Lane D, Rothenbuehler R, Merrilat A-M, Aiken C. 1987. Analysis of the F plasmid centromere. *Mol.Gen.Genet.* 207: 406-12.

- Lax AJ, Pullinger GD, Baird GD, Williamson CM. 1990. The virulence plasmid of *Salmonella dublin*: Detailed restriction map and analysis by transposon mutagenesis. *J.Gen.Microbiol.* **136**: 1117-23.
- Light J, Molin S. 1983. Post-transcriptional control of expression of the *repA* gene of plasmid R1 mediated by a small RNA molecule. *EMBO J.* **2**: 93-8.
- Lovett MA, Helinski DR. 1976. Method for the isolation of the replication region of a bacterial replicon: construction of a mini F'-Km plasmid. *J.Bacteriol.* **127**: 982-7.
- Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ, McCowen JM. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: Convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* **1**: 417-20.
- Mandel M, Higa A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J.Mol.Biol.* **53**: 154-7.
- Martin KA, Davis MA, Austin S. 1991. Fine-structure analysis of the P1 plasmid partition site. *J.Bacteriol.* **173**: 3630-4.
- Martin KA, Friedman SA, Austin SJ. 1987. Partition site of the P1 plasmid. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**: 8544-7.
- Masai H, Arai K. 1987. RepA and DnaA proteins are required for initiation of R1 plasmid replication in vitro and interact with the *oriR* sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**: 4781-5.
- Matsui H, Abe A, Kawahara K, Terakado N, Danbara H. 1991. Positive regulator for the expression of Mba protein of the virulence plasmid, pKDSC50, of *Salmonella choleraesuis*. *Microb.Pathog.* **10**: 459-64.
- Matsui H, Abe A, Suzuki S, Kijima M, Tamura Y, Nakamura M, Kawahara K, Danbara H. 1993. Molecular mechanism of the regulation of expression of plasmid-encoded mouse bacteremia (*mba*) genes in *Salmonella* serovar Choleraesuis. *Mol.Gen.Genet.* **236**: 219-26.
- Matsui H, Kawahara K, Terakado N, Danbara H. 1990. Nucleotide sequence of a gene encoding a 29 KDa polypeptide in *mba* region of the virulence plasmid, pKDSC50, of *Salmonella choleraesuis*. *Nucleic Acid Res.* **18**: 1055-6.
- McClelland M, Jones R, Patel Y, Nelson M. 1987. Restriction endonucleases for pulse field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **15**: 5985-6005.
- Meacock P, Cohen S. 1980. Partitioning of bacterial plasmids during cell division. A *cis*-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance in cell populations. *Cell* **20**: 529-42.
- Michiels T, Popoff MY, Durviaux S, Coynault C, Cornelis G. 1987. A new method for the physical and genetic mapping of large plasmids: application to the localisation of the virulence determinants on the 90 kb plasmid of *Salmonella typhimurium*. *Microb.Pathog.* **3**: 109-16.
- Miki T, Chang Z-T, Horiuchi T. 1984. Control of cell division by sex factor in *E. coli*. II. Identification of genes for inhibitor protein and trigger protein on the 42.84-43.6 F segment. *J.Mol.Biol.* **174**: 627-46.
- Miki T, Easton AM, Rownd RH. 1980. Cloning of replication, incompatibility, and stability functions of R plasmid NR1. *J.Bacteriol.* **141**: 87-99.
- Miyazaki C, Kawai Y, Ohtsubo H, Ohtsubo E. 1988. Unidirectional replication of plasmid R100. *J.Mol.Biol.* **204**: 331-43.
- Moll A, Manning PA, Timmis KN. 1980. Plasmid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer membrane protein, the *traT* gene product, is responsible for plasmid-specified serum resistance in *E. coli*. *Infect.Immun.* **28**: 359-67.
- Montenegro MA, Morelli G, Helmuth R. 1991. Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence in isolates of defined sources. *Microb.Pathog.* **11**: 391-7.
- Mori H, Kondo A, Ohshima A, Ogura T, Hiraga S. 1986. Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning. *J.Mol.Biol.* **192**: 1-15.
- Mori H, Mori Y, Ichinose C, Niki H, Ogura T, Kato A, Hiraga S. 1989. Purification and characterization of SopA and SopB proteins essential for F plasmid partitioning. *J.Biol.Chem.* **264**: 15535-41.
- Nakamura M, Sato S, Ohya T, Suzuki S, Ikeda S. 1985. Possible relationship of a 36-Megadalton *Salmonella enteritidis* plasmid to virulence in mice. *Infect.Immun.* **47**: 831-3.
- Nordström K. 1985. Control of plasmid replication: theoretical considerations and practical solutions. En: Helinski, D.R., Cohen, S.N., Clewell, D.B., Jackson, D.A., Hollaender, A. (Eds.) *Plasmids in bacteria*. New York: Plenum Publishing Corp. p. 189-214.

- Nordstrom K, Molin S, Aagaard-Hansen H. 1980. Partitioning of plasmid R1 in *E. coli*. I. Kinetics of loss of plasmid derivatives deleted for the *par* region. *Plasmid* 4: 215-27.
- Norel F, Coynault C, Miras I, Hermant D, Popoff MY. 1989. Cloning and expression of plasmid DNA sequences involved in *Salmonella* serotype Typhimurium virulence. *Mol.Microbiol.* 3 (6): 733-43.
- Norel F, Robbe-Saule V, Popoff MY, Coynault C. 1992. The putative sigma factor KatF (RpoS) is required for the transcription of the *Salmonella typhimurium* virulence gene *spvB* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett.* 78: 271-6.
- Novick R-P. 1978. Plasmid incompatibility. *Microbiol.Rev.* 51: 381-95.
- O'Byrne CP, Dorman CJ. 1994. The *spv* virulence operon of *Salmonella typhimurium* LT2 is regulated negatively by the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein system. *J.Bacteriol.* 176: 905-12.
- Ogura T, Hiraga S. 1983. Partition mechanisms of F plasmid: two plasmid gene-encoded products and a *cis*-acting region are involved in partition. *Cell* 32: 351-60.
- Ortega S, Lanka E, Diaz R. 1986. The involvement of host replication proteins and of specific origin sequences in the in vitro replication of miniplasmid R1 DNA. *Nucleic Acids Res.* 14: 4865-79.
- Pai SK, Chattoraj DK. 1988. P1 plasmid replication: Initiator sequestration is inadequate to explain control by initiator-binding sites. *J.Bacteriol.* 170: 3554-60.
- Pardon P, Popoff MY, Coynault C, Marly J, Miras I. 1986. Virulence-associated plasmids of *Salmonella* serotype Typhimurium in experimental murine infection. *Ann.Inst.Pasteur/Microbiol* 137 B: 47-60.
- Pérez-Casal JF, Crosa JH. 1987. Novel incompatibility and partition *loci* for the REPI replication region of plasmid pColV-K30. *J.Bacteriol.* 169: 5078-86.
- Pérez-Casal, JF, Gammie AE, Crosa, JH. 1989. Nucleotide sequence analysis and expression of the minimum REPI replication region and incompatibility determinants of pColV-k30. *J.Bacteriol.* 171: 2195-201.
- Pullinger GD, Baird GD, Williamson CM, Lax AJ. 1989. Nucleotide sequence of a plasmid gene involved in the virulence of salmonellas. *Nucleic Acids Res.* 17: 7983.
- Pullinger GD, Lax AJ. 1992. A *Salmonella dublin* virulence plasmid locus that affects bacterial growth under nutrient-limited conditions. *Mol.Microbiol* 6: 1631-43.
- Rhen M, O'Connor D, Sukupolvi S. 1988. The outer membrane permeability mutation of the virulence-associated plasmid of *Salmonella typhimurium* is located in a *traT*-like gene. *FEMS Microbiol.Lett.* 52: 145-54.
- Rhen M, Riikonen P, Taira S. 1993. Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* virulence plasmid genes in cultured macrophages. *Mol.Microbiol.* 10: 45-56.
- Riikonen P, Makela PH, Saarilahti H, Sukupolvi S, Taira S, Rhen M. 1992. The virulence plasmid does not contribute to growth of *Salmonella* in cultured murine macrophages. *Microb.Pathog.* 13: 281-91.
- Roberts MC, Hillier SL. 1990. Genetic basis of tetracycline resistance in urogenital bacteria. *Antimicrob.Agents Chemother.* 34: 261-4.
- Roudier C, Krause M, Fierer J, Guiney DG. 1990. Correlation between the presence of sequences homologous to the *vir* region of *Salmonella dublin* plasmid pSDL2 and the virulence of twenty-two *Salmonella* serotypes in mice. *Infect.Immun.* 58: 1180-5.
- Rownd, R.H., Womble, D.D., Dong, X., et al. 1985. Incompatibility and IncFII plasmid replication control. En: Helinski, D.R., Cohen, S.N., Clewell, D.B., Jackson, D.A., Hollaender, A. (Eds.) *Plasmids in bacteria*. New York: Plenum Publishing Corp. p. 335-54.
- Ryu J, Hartin RJ. 1990. Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2. *BioTechniques* 8: 43-4.
- Saul D, Spiers J, McAnulty J, Gibbs MG, Bergquist PL, Hill DF. 1989. Nucleotide sequence and replication characteristics of RepFIB, a basic replicon of IncF plasmids. *J.Bacteriol.* 171: 2697-707.
- Scott J-R. 1984. Regulation of plasmid replication. *Microbiol.Rev.* 48: 1-23.
- Shultz J, Silhavy TJ, Berman ML, Fili N, Emr SD. 1982. A previously unidentified gene in the *spo* operon of *E. coli* K12 specifies a component of the protein export machinery. *Cell* 31: 227-35.
- Spiers AJ, Bergquist PL. 1992. Expression and regulation of the RepA protein of the RepFIB replicon from plasmid P307. *J.Bacteriol.* 174: 7533-41.

- Spiers AJ, Bhana N, Bergquist PL. 1993. Regulatory interactions between RepA and essential replication protein, and the DNA repeats of RepFIB from plasmid P307. *J.Bacteriol.* **175**: 4016-24.
- Spink JM, Pullinger GD, Wood MW, Lax AJ. 1994. Regulation of *spvR*, the positive regulatory gene of *Salmonella* plasmid virulence genes. *FEMS Microbiol Lett.* **116**: 113.
- Stirling CJ, Stewart G, Sherratt DJ. 1988. Multicopy plasmid stability in *E. coli* requires host-encoded functions that lead to plasmid site-specific recombination. *Mol.Gen.Genet.* **214**: 80-4.
- Stougaard P, Molin S, Nordstrom K. 1981. RNAs involved in copy number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **78**: 6008-12.
- Sukupolvi S, Riikonen P, Taira S, Saarilahti H, Rhen M. 1992. Plasmid-mediated serum resistance in *Salmonella enterica*. *Microb.Pathog.* **12**: 219-25.
- Sukupolvi S, Vaara M, Helander IM, Viljanen P, Mäkelä PH. 1984. New *Salmonella typhimurium* mutants with altered outer membrane permeability. *J.Bacteriol.* **159**: 704-12.
- Sukupolvi S, Vuorio R, Qi S-Y, O'Connor D, Rhen M. 1990. Characterization of the *traT* gene and mutants that increase outer membrane permeability from the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *Mol.Microbiol.* **4**: 49-57.
- Tabuchi A, Min YN, Womble DD, Rownd RH. 1992. Autoregulation of the stability operon of the IncFII plasmid NR1. *J.Bacteriol.* **174**: 7629-34.
- Taira S, Rhen M. 1989. Identification and genetic analysis of *mkaA*--A gene of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid necessary for intracellular growth. *Microb.Pathog.* **7**: 165-73.
- Taira S, Riikonen P, Saarilahti H, Sukupolvi S, Rhen M. 1991. The *mkaC* virulence gene of the *Salmonella* serovar Typhimurium 96 kb plasmid encodes a transcriptional activator. *Mol.Gen.Genet.* **228**: 381-4.
- Tang XB, Womble DD, Rownd RH. 1989. DnaA protein is not essential for replication of IncFII plasmid NR1. *J.Bacteriol.* **171**: 5290-5.
- Terakado N, Hamaoka T, Danbara H. 1988. Plasmid mediated serum resistant and alteration in the composition of lipopolysaccharides in *Salmonella dublin*. *J.Gen.Microbiol.* **134**: 2089-93.
- Terakado N, Sekizaki T, Hashimoto K, Naitoh S. 1983. Correlation Between the Presence of a Fifty-Megadalton Plasmid in *Salmonella dublin* and Virulence for Mice. *Infect.Immun.* **41** (1): 443-4.
- Terakado N, Ushijima T, Samejima T, Ito H, Hamaoka T, Murayama S, Kawahara K, Danbara H. 1990. Transposon insertion mutagenesis of a genetic region encoding serum resistance in an 80 kb plasmid of *Salmonella dublin*. *J.Gen.Microbiol.* **136**: 1833-8.
- Tinge SA, Curtiss R, III. 1990. Conservation of *Salmonella typhimurium* virulence plasmid maintenance regions among *Salmonella* serovars as a basis for plasmid curing. *Infect.Immun.* **58**: 3084-92.
- Tinge SA, Curtiss R, III. 1990. Isolation of the replication and partitioning regions of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid and stabilization of heterologous replicons. *J.Bacteriol.* **172**: 5266-77.
- Trawick JD, Kline BC. 1985. A two-stage molecular model for control of mini-F replication. *Plasmid* **13**: 59-69.
- Usera MA, Echelza A, Aladueña A. 1992. Estudio de las cepas de *Salmonella* recibidas en el laboratorio de referencia de servicio de bacteriología del CNMVIS durante el año 1991. *Boletín Microbiológico Semanal* **3**: 1-8.
- Valone SE, Chikami GK, Miller VL. 1993. Stress induction of the virulence proteins (SpvA, -B, and -C) from native plasmid pSDL2 of *Salmonella dublin*. *Infect.Immun.* **61**: 705-13.
- Vandenbosch JL, Kurlandsky DR, Urdangaray R, Jones GW. 1989. Evidence of coordinate regulation of virulence in *Salmonella typhimurium* involving the *rsk* element of the 95-kilobase plasmid. *Infect.Immun.* **57** (8): 2566-8.
- Vandenbosch JL, Rabert DK, Jones GW. 1987. Plasmid-associated resistance of *Salmonella typhimurium* to complement activated by the classical pathway. *Infect.Immun.* **55** (11): 2645-52.
- Vandenbosch JL, Rabert DK, Kurlandsky DR, Jones GW. 1989. Sequence analysis of *rsk*, a portion of the 95-kilobase plasmid of *Salmonella typhimurium* associated with resistance to the bactericidal activity of serum. *Infect.Immun.* **57** (3): 850-7.
- Vanooteghem J-C, Cornelis GR. 1990. Structural and functional similarities between the replication region of the *Yersinia* virulence plasmid and the RepFIIA replicons. *J.Bacteriol.* **172**: 3600-8.

- Wagner EGH, Blomberg P, Nordstrom K. 1992. Replication control in plasmid R1: duplex formation between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is not required for inhibition of RepA synthesis. *EMBO J.* **11**: 1195-203.
- Williams DR, Thomas CM. 1992. Active partitioning of bacterial plasmids. *J.Gen.Microbiol.* **138**: 1-16.
- Williamson CM, Baird GD, Manning EJ. 1988. A common virulence region on plasmids from eleven serotypes of *Salmonella*. *J.Gen.Microbiol.* **134**: 975-82.
- Womble DD, Dong X, Wu RP, Luckow VA, Martínez AF, Rownd RH. 1984. IncFII plasmid incompatibility product and its target are both RNA transcripts. *J.Bacteriol.* **160**: 28-35.
- Womble DD, Sampathkumar P, Easton AM, Luckow VA, Rownd RH. 1985. Transcription of the replication control region of the IncFII R-plasmid NR1 *in vitro* and *in vivo*. *J.Mol.Biol.* **181**: 395-410.
- Wu R, Wang X, Womble DD, Rownd RH. 1992. Expression of the *repA1* gene of IncFII plasmid NR1 is translationally coupled to expression of an overlapping leader peptide. *Journal of Bacteriology* **174**: 7620-8.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-8.
- Yother J, Chamness TW, Goguen JD. 1986. Temperature-controlled plasmid regulon associated with low calcium response in *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.* **165**: 443-7.

Presidente:  
Dr. C. Noukela

Vocales:  
Dr. F. García Portillo

Dr. C. Guesla

Dr. I. Soluvi

Secretario:  
Dr. I. Ma

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal que al  
margen se expresa, para juzgar esta tesis doctoral,  
acordó por Unanimidad calificarla  
de Apto para leer  
Madrid, 1 de Julio de 1971

El Secretario del Tribunal

